Claudiu T. SUPURAN Gheorghe MANOLE

INHIBITORII ANHIDRAZEI CARBONICE

Sinteze, reacții și aplicații terapeutice

EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE

Scanned with OKEN Scanner

CLAUDIU T. SUPURAN GHEORGHE MANOLE

INHIBITORII ANHIDRAZEI CARBONICE

Sinteze, reacții și aplicații terapeutice

Scanned with OKEN Scanner

Copyright © Editura Academiei Române, 1999.
Toate drepturile asupra acestei ediţii sunt rezervate editurii.

Adresa: EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE
RO-76117 – Bucureşti, România
Calea 13 Septembrie, nr. 13, sector 5
Tel. 401-4119008
Tel/fax: 401-4103983; 401-4103448
e-mail: edacad@ear.ro

EDITAT CU SPRIJINUL AGENŢIEI NAŢIONALE PENTRU ŞTIINŢĂ, TEHNOLOGIE ŞI INOVARE

Redactor: DOINA ARGEŞANU
Tehnoredactor: MARIANA ŞERBĂNESCU
Coperta: GIGI GAVRILĂ

Bun de tipar: 29.11.1999. Format: 16/70×100.
Coli tipar: 11,50.
C.Z. pentru biblioteci mari: 577.154.4:612.015.1
C.Z. pentru biblioteci mici: 57

ISBN 973-27-0731-3

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Monografia *Inhibitorii anhidrazei carbonice – sinteze, reacții și aplicații terapeutice* se înscrie prin specific în domeniul lucrărilor de cercetare fundamentală interdisciplinară, cu aplicabilitate majoră în design-ul compușilor biologic activi, enzimologie, terapia și prevenirea unor boli ale omului sau animalelor, precum și în domeniul investigațiilor clinice moderne de tipul rezonanței magnetice nucleare, al tomografiei computerizate etc.

Tema cărții vizează o clasă de agenți farmacologici larg utilizați în practica medicală. În ultimii 45 de ani, pentru terapia unui mare număr de afecțiuni – sulfonamidele cu proprietăți inhibitorii asupra anhidrazei carbonice, o enzimă larg răspândită în bacterii, plante și animale.

Lucrarea este structurată în patru părți. Prima parte (capitolele 1-4) prezintă, pe baza datelor din literatura, istoria și cunoștințele la zi referitoare la structura și chimia anhidrazei carbonice, în paralel cu cele privind inhibitorii săi, precum și metodele de purificare, proprietățile izoenzimelor cunoscute actualmente (din bacterii, plante, vertebrate). Structura situsului activ al izoenzimelor studiate în detaliu (tipurile I-III), precum și reacțiile catalizate de acestea constituie alte elemente prezentate în această primă secțiune a lucrării, concomitent cu o descriere detaliată a mecanismului catalitic și de inhibiție al enzimei. Sunt prezentate principalele metode de studiu ale mecanismelor menționate mai sus, cu accent pe tehnicile spectroscopice și de cristalografie de raze X.

Partea a doua a lucrării (capitolul 5) trece în revistă principalele clase de inhibitori de tip sulfonamidic ai anhidrazei carbonice: sulfonamidele aromatice, heterociclice, bis-sulfonamidele, inhibitorii cu gruparea sulfonamidică modificată sau inhibitorii specifici de izoenzimă. Pentru fiecare clasă de inhibitori sunt prezentate sintezele compușilor, proprietățile fizico-chimice relevante pentru specificul activității biologice, precum și date de inhibiție pentru diverse izoenzime. În evaluarea și prezentarea acestor date au fost fructificate ultimele noutăți din literatura de profil a acestui domeniu de cercetare aflat într-o continuă dezvoltare, precum și date originale obținute în laboratoarele autorilor.

Partea a treia a monografiei (capitolul 6) prezintă o nouă clasă de inhibitori ai anhidrazei carbonice – combinațiile complexe ale sulfonamidelor aromatice și heterociclice. Această clasă de inhibitori a fost raportată în literatura de specialitate, după 1990, de către autorii acestei cărți. Pentru această clasă de compuși au fost prezentate metodele de sinteză, determinările structurale, determinarea proprietăților fizico-chimice și a celor biologice de inhibiție, ceea ce a

Scanned with OKEN Scanner

permis încadrarea acestor compuşi printre derivaţii cei mai activi ca inhibitori ai activităţii anhidrazei carbonice.

Ultima parte a acestei monografii are un caracter farmacologic, prezentând specificitatea de acţiune a inhibitorilor topici şi sistemici cu aplicaţii oftalmologice, aplicaţiile inhibitorilor sistemici în terapia diverselor dezechilibre acido-bazice, ca diuretice ori ca medicaţie în tratamentul bolii ulceroase, glaucomului, răului de mişcare sau altitudine, epilepsiei etc. De asemenea, în această ultimă parte a lucrării este prezentată şi posibilitatea utilizării ca mijloace de investigare paraclinică a inhibitorilor marcaţi ai anhidrazei carbonice.

Noţiunile şi elementele prezentate în această lucrare, privind sinteza, structura şi proprietăţile fizico-chimice şi farmacologice ale acestor substanţe inhibitoare ale anhidrazei carbonice pot constitui referinţe pentru alte cercetări, cum ar fi cele privind validarea şi implementarea de noi medicamente de acest tip în terapia unor boli din patologia umană şi veterinară.

Prin conţinutul său, monografia *Inhibitorii anhidrazei carbonice – sinteze, reacţii şi aplicaţii terapeutice* se poate înscrie între lucrările de referinţă în acest domeniu. Acest loc bibliografic îi este rezervat nu numai de caracterul temei lucrării, dar şi de specificul său interdisciplinar, care se adresează unei largi categorii de specialişti, de la chimişti organicieni şi bio-organicieni la chimişti bio-anorganicieni, biochimişti, biotehnologi, farmacologi, farmacişti şi medici în diverse specialităţi de la internişti la oftalmologi.

Lucrarea poate fi utilă studenţilor din specialităţile menţionate sau celor care doresc să pătrundă misterele cataliziei enzimatice, spre a înţelege la nivel molecular mecanismul de acţiune al unor droguri, al apariţiei unor boli precum şi modul în care pot fi tratate aceste afecţiuni prin modularea activităţii unei enzime.

Suntem recunoscători doamnei Monica Ilieş şi domnului Marc A. Ilieş pentru ajutorul în redactarea versiunii finale a manuscrisului, precum şi pentru contribuţiile ştiinţifice în acest domeniu, care sunt menţionate în capitolele dedicate sulfonamidelor.

Autorii

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

PREFAȚĂ 5
ABREVIERI 9

1. INTRODUCERE. Generalități privind locul și rolul anhidrazei carbonice în organismul uman. Scurt istoric 11

2. IZOZIMELE ANHIDRAZEI CARBONICE 13

2.1. Purificare, distribuție și proprietăți ale izozimelor anhidrazei carbonice 13
2.2. Structura situsului activ al anhidrazei carbonice 16
2.3. Aspecte cinetice și termodinamice ale reacțiilor catalizate de anhidraza carbonică 20

3. MECANISMUL CATALITIC AL ANHIDRAZEI CARBONICE 25

4. MECANISMUL DE INHIBIȚIE AL ANHIDRAZEI CARBONICE 29

4.1. Inhibiția prin anioni monovalenți 29
4.2. Inhibiția cu sulfonamide 45
4.3. Inhibiția dublă 60
4.4. Inhibitori competitivi cu CO_2 61

5. SULFONAMIDELE CA INHIBITORI AI ANHIDRAZEI CARBONICE. 63

5.1. Inhibitori clasici 63
5.1.1. *Sulfonamidele aromatice* 63
5.1.2. *Sulfonamidele heterociclice* 71
5.1.3. *Bis-sulfonamidele* 77
5.2. Inhibitori selectivi 79
5.2.1. *Sulfonamide topice utilizate ca agenți antiglaucomatoși* ... 79
5.2.2. *Vasodilatatori cerebrali selectivi* 96
5.3. Inhibitori cu gruparea sulfonamidică modificată 96
5.4. Inhibitori specifici pentru diversele izozime ale anhidrazei carbonice 100
5.4.1. *Inhibitori macromoleculari* 101
5.4.2. *Sulfonamide cationice* 102
5.5. Relații cantitative structură chimică – activitate biologică (quantitative structure – activity relationship, QSAR) pentru inhibitorii anhidrazei carbonice 108
5.6. Sulfonamidele alifatice ca inhibitori ai anhidrazei carbonice 110

Scanned with OKEN Scanner

6. COMBINAȚIILE COMPLEXE CA INHIBITORI AI ANHIDRAZEI CARBONICE 113
6.1. Complecşi ai acetazolamidei 114
6.2. Complecşi ai metazolamidei 120
6.3. Complecşi ai etoxzolamidei 123
6.4. Complecşi ai zaharinei 125
6.5. Complecşi cu alte sulfonamide 127
7. FARMACOLOGIA INHIBITORILOR ANHIDRAZEI CARBONICE 129
7.1. Inhibitori sistemici 130
7.2. Inhibitori topici 134
8. APLICAȚIILE INHIBITORILOR ANHIDRAZEI CARBONICE ÎN MEDICINĂ 137
8.1. Inhibitorii anhidrazei carbonice şi echillibrul acido-bazic 137
8.2. Inhibitorii anhidrazei carbonice şi fiziologia renală 141
8.3. Aplicații în gastroenterologie 146
8.3.1. *Anhidraza carbonică şi funcția secretorie gastrică* 146
8.3.2. *Tratamentul ulcerelor gastro-duodenale cu inhibitori ai anhidrazei carbonice* 150
8.3.3. *Rolul anhidrazei carbonice în tractul intestinal şi la nivelul glandelor digestive anexe* 153
8.4. Tratamentul glaucomului cu inhibitori ai anhidrazei carbonice 154
8.5. Utilizarea inhibitorilor anhidrazei carbonice în epilepsie 157
8.6. Utilizarea inhibitorilor anhidrazei carbonice în terapia răului de altitudine şi mişcare 159
8.7. Inhibitorii anhidrazei carbonice şi substanța osoasă 160
8.8. Utilizarea inhibitorilor anhidrazei carbonice radiomarcați în explorări paraclinice 163
8.9. Benzotiazidele şi diureticele de ansă ca inhibitori ai anhidrazei carbonice 164

BIBLIOGRAFIE 168
CONTENTS 179
ABSTRACT 181

Scanned with OKEN Scanner

ABREVIERI

PET	- (Positron Emitting Tomography) - tomografie prin emisie de pozitroni;
QSAR	- (Quantitative Structure Activity Relationship) - relaţii cantitative structură - activitate biologică;
AC	- anhidraza carbonică;
IAC	- inhibitor(i) al (ai) anhidrazei carbonice;
AAC	- activator(i) al (ai) anhidrazei carbonice;
SDS	- sodiu dodecilsulfat;
^{13}C-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{13}C;
^{35}Cl-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{35}Cl;
^{81}Br-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{81}Br;
^{1}H-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{1}H;
^{15}N-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{15}N;
^{17}O-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{17}O;
^{113}Cd-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{113}Cd;
^{19}F-RMN	- rezonanţa magnetică nucleară de ^{19}F;
UV-VIS (spectrometrie de)	- spectrometrie în domeniul ultraviolet şi vizibil;
IR (spectrometrie de)	- spectrometrie în domeniul infraroşu;
RPE	- rezonanţa paramagnetică nucleară;
DC	- dicroism circular;
Co-AC	- cobalt-anhidraza carbonică;
Ni-AC	- nichel-anhidraza carbonică;
Cu-AC	- cupru -anhidraza carbonică;
Zn-AC	- zinc-anhidraza carbonică (enzima nativă);
Mn-AC	- mangan-anhidraza carbonică;
Cd-AC	- cadmiu-anhidraza carbonică;
NOE	- Nuclear Overhauser Effect - efect nuclear Overhauser;
DMSO	- dimetilsulfoxid;
DMF	- dimetilformamida;
EI	- complex enzimă-inhibitor;
SEI	- (tehnica) substrat-enzimă inhibitor;
NCS	- *N*-clorosuccinimida;
DBN	- diazabicilononan;
QAS	- clorura de *p*-trimetilamoniobenzensulfonamidă;
DCCI	- diciclohexilcarbodiimida;
CNDO	- (Complete Neglect of Differential Overlap) - neglijarea totală a suprapunerii diferenţiale (a orbitalilor);
HAAZ	- acetazolamida;
HMZA	- metazolamida;
HEZA	- etoxzolamida;
HSAC	- zaharina;
NaSAC	- sarea de sodiu a zaharinei;
TSN	- tosilhidrazida;
HCTS	- sulfonamide cationice;
HTTS	- sulfonamide cu restul tioureido;
TSH	- tosilhidrazida;
SNC	- sistem nervos central;
PIO	- (Pressure IntraOcular) - presiunea intraoculară;
ppm	- părţi per milion.

Scanned with OKEN Scanner

1. INTRODUCERE

Generalităţi privind locul şi rolul anhidrazei carbonice în organismul uman. Scurt istoric

Experienţele realizate în primele două decenii ale secolului nostru privind determinarea naturii fizico-chimice a sângelui au permis între altele şi identificarea enzimei anhidraza carbonică (AC). Aceste studii privind homeostazia organismului au stabilit că dioxidul de carbon este transportat din ţesuturi spre plămâni sub forma ionilor de bicarbonat [1]. Din punctul de vedere al cineticii moleculare se demonstrase că reacţia de hidratare a CO_2 şi cea inversă de deshidratare a HCO_3^-:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \qquad (1)$$

sunt procese relativ lente [2,3].

Pe de altă parte, Henriques [4] a stabilit că reacţia dintre CO_2 şi o amină este de asemenea reversibilă, dar mult mai rapidă. Folosirea metodelor de dializă a permis determinarea cantităţii de carbamat transportată de hemoglobina (R-NH-COOH) prezentă în sânge:

$$R\text{-}NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons R\text{-}NH\text{-}COOH \qquad (2)$$

Prin metode relativ rudimentare (prin expunerea sângelui la vacuum), în aceeaşi perioadă, a fost cuantificată viteza de eliberare a CO_2 din acest fluid.

Concluzia acestor cercetări a fost că dioxidul de carbon este transportat în sânge exclusiv sub formă de carboxi-hemoglobină, ionul HCO_3^- şi acidul carbonic H_2CO_3 jucând un rol secundar în respiraţie [4].

Cercetările lui Henriques sus-menţionate au fost contestate însă de către Van Slyke [5], care a demonstrat că viteza de eliberare a CO_2 este prea rapidă pentru ca procesul să nu implice un catalizator. Potrivit studiilor sale, prezenţa unei mici cantităţi de hemoglobină accelerează puternic procesul de eliberare a CO_2 din ionul bicarbonat, ceea ce a condus la concluzia că hemoglobina catalizează una din reacţiile în urma căreia se eliberează CO_2.

La începutul anilor '30, hemoglobina preparată după metoda Adair [6], era considerată ca un produs pur. Aprofundarea studiilor în acest domeniu în 1932, de către Meldrum şi Roughton (Univ. Oxford, Anglia) a condus la identificarea proprietăţii catalitice menţionate mai sus doar în supernatantul rezultat după centrifugarea suspensiei hemoglobinei în cloroform. Activitatea catalitică a

Scanned with OKEN Scanner

„supernatantului" a fost atribuită unei enzime, denumită de către Eggleton anhidraza carbonică (AC).

Meldrum şi Roughton au descoperit enzima doar în eritrocite, nu şi în plasmă sau în alte ţesuturi. În 1938, Davenport descoperă AC la nivelul rinichiului şi în celula oxintică a mucoasei gastrice [8,9], imaginând concomitent schema procesului secreţiei gastrice acide, în care enzima intervine activ. La acest nivel AC contribuie la geneza ionilor H^+, ca urmare a hidratării CO_2.

În aceeaşi perioadă, Mann şi Keilin demonstrează că AC este o metalo-proteină, cu masa de aproximativ 30 kDa, care conţine un ion de Zn(II) în molecula [10].

La începutul deceniului al şaselea, prin lucrările lui Friedenwald [11], Wistrand [12] şi Kingsley [13] se evidenţiază implicarea anhidrazei carbonice de la nivelul proceselor ciliare în producerea umorii apoase a ochiului, precum şi în patologia glaucomului.

Cercetările ulterioare în legătură cu rolul şi locul AC în organism au fost concentrate, în special asupra obţinerii de droguri cu rol inhibitor asupra activităţii enzimei. Descoperirea de către Mann şi Keilin a inhibitorilor sulfonamidici [10], iar apoi a sulfonamidelor heterociclice cu aplicaţii importante în practica medicală [14,15], au impulsionat incontestabil aceste cercetări. Astfel, o sulfonamidă inhibitoare a AC, acetazolamida (5-acetamido-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida), a fost primul diuretic non-mercurial introdus în terapia umană, fiind utilizat şi în prezent [15].

Importanţa acestor studii reiese şi din faptul că au permis:

a) descifrarea mecanismului catalitic şi de inhibiţie al enzimei AC;

b) corelaţii importante între structura chimică şi activitatea biologică pentru diverşii compuşi care interacţionează cu AC, ceea ce a condus la design-ul unor inhibitori deosebit de puternici, specifici anumitor izozime sau selectivi pentru ţesuturile în care enzima este prezentă. Mai mult, aceste cercetări au condus la descoperirea diureticelor tiazidice (1960) şi a diureticelor de ansă (1970), două clase de agenţi farmacologici larg utilizaţi actualmente în terapia şi prevenirea unei multitudini de afecţiuni cardio-vasculare.

Din aceste motive, se poate justifica interesul unui important număr de cercetători din întreaga lume de a aprofunda explicarea implicării la nivel molecular a AC în procesele catalitice şi de inhibiţie, cât şi de a obţine noi clase şi tipuri de inhibitori.

Aceste aspecte chimice explică şi necesitatea editării acestei monografii, deşi în 1967 Maren a redactat o lucrare [16] cuprinzând principalele aspecte ale chimiei, fiziologiei şi farmacologiei acestei enzime, iar mai recent Lindskog şi Wistrand [17] au publicat un capitol de carte cu aceeaşi tematică. Între timp însă au fost realizate progrese importante atât în descifrarea mecanismelor de inhibiţie/cataliză a acestei enzime, cât şi în obţinerea de inhibitori cu proprietăţi diverse de compuşii clasici, intraţi în practica medicală la începutul anilor '60, ceea ce a impus aducerea la zi a acestor date.

Prezenta lucrare, prima de acest gen în România, va aborda primordial date detaliate referitoare la chimia şi biochimia inhibitorilor de anhidrază carbonică (IAC) cu implicaţiile lor în practica medicală curentă. Literatura de specialitate din domeniu a fost consultată până în martie 1999.

Scanned with OKEN Scanner

2. IZOZIMELE ANHIDRAZEI CARBONICE

2.1. Purificarea, distribuţia şi proprietăţile izozimelor anhidrazei carbonice

Anhidraza carbonică este o liază, care catalizează adiţii la legăturile C=O, având numărul de catalog EC 4.2.1.1.; este desemnată prescurtat CA* (carbonic anhydrase). Cifra latină care o urmează desemnează izozimă (I-X).

De menţionat că, până la sfârşitul anilor '70, desemnarea izoenzimelor includea litere: B pentru AC I, C indicând AC II şi M reprezentând AC III, izolată din muşchi.

Studiile de histochimie, izolare şi purificare au identificat până în prezent opt izoenzime ale AC (AC I–VIII) şi două proteine înrudite cu enzima (CA-like proteins), AC IX şi AC X în vertebratele superioare. În plante şi microorganisme au fost de asemenea identificate enzime de acest tip, cu structuri diverse însă [18]. Dintre enzimele izolate în vertebrate:

– patru sunt forme citosolice: AC I, II, III, VII;

– două asociate membranelor/mitocondriilor: AC IV, asociată membranei plasmatice, iar AC V fiind izolată din matricea mitocondrială;

– AC VI este singura formă secretată, evidenţiabilă în saliva vertebratelor superioare.

Genele reprezentative au fost caracterizate pentru izozimele I, II, III şi VII, acestea având structuri similare, de şapte exoni (cu excepţia genei pentru AC I) [18, 19].

Izolarea şi purificarea izoenzimelor din hemolizatele eritrocitare umane sau bovine au inclus ca tehnici de lucru cromatografia pe schimbători de ioni [20,21], electroforeza pe gel de amidon [22], gel-filtrarea pe Sephadex G-75 [23], cromatografia pe coloane de hidroxiapatita [21], iar determinarea secvenţei de aminoacizi a acestor proteine a fost realizată conform metodei clasice de degradare după Edman [23-25].

Izoenzimele clasice, AC I şi AC II au fost purificate şi studiate independent la universităţile din Uppsala (Göteborg) şi Marsilia, precum şi la Universitatea Harvard, constatându-se că:

a) AC I este formată din 260 resturi de aminoacizi, având masa moleculară M_r=28850 Da;

b) AC II conţine 259 resturi de aminoacizi şi are masa moleculară M_r=29300 Da [17].

---

* Din motive lingvistice, pentru limba română am adoptat abrevierea „AC".

Scanned with OKEN Scanner

Ambele proteine sunt distribuite predominant în eritrocite sub următoarele forme: 85% din cantitatea totală de AC este sub forma izozimei lente, AC I, iar restul de 15% sub forma AC II (izozimă rapidă). Prezența izozimelor AC I şi AC II a mai fost evidențiată la nivelul mucoasei gastrice, rinichiului, ficatului, uveei anterioare, precum şi în alte țesuturi [8,9,16,26].

Deşi prezența în eritrocite, rolul izozimei AC I la acest nivel este încă controversat deoarece:

– eritrocitele conțin suficient de multă izozimă rapidă (AC II), care este capabilă singură să satisfacă necesitățile de hidratare şi de transport ale CO_2/HCO_3^-; această dilemă este acutizată de calculele lui Maren [16], care a demonstrat că izozima AC II este prezentă într-un exces considerabil şi că nu este niciodată factorul limitativ al acestor procese;

– la concentrația ionilor de Cl^- din plasmă, izozima AC I este în parte inhibată.

Studiile lui Tashian şi colaboratorii [27,28] au arătat că indivizii homozigoți cu deficiența pentru gena reglatoare a sintezei AC I, deşi au nivelul de izozimă infim, sunt asimptomatici, iar principalele componente hematologice sunt normale sub aspect funcțional. Aceasta, spre deosebire de persoanele cu deficiență pentru gena AC II, care dezvoltă clinic un sindrom de osteoporoză, cu acidoza tubulară şi calcifiere cerebrală [28].

Cercetările privind apariția şi evoluția vieții pe pământ datează existența genei primitive reglatoare a sintezei AC în urmă cu aproximativ trei miliarde de ani [18].

Izoenzima AC III reprezintă subtipul de AC distribuită preferențial în mușchii striați ai mamiferelor, predominând în fibrele musculare lente de tip I [29-32]. Izozima AC III a fost evidențiată şi la nivel hepatocitar, unde i se atribuie rolul de a interveni în reglarea metabolismului intermediar local [33]. Izoenzima are o acțiune lentă, rezistentă la inhibiția cu sulfonamide [34]. Fizico-chimic, izozima AC III are masa moleculară M_r=29000 Da; se pare că rolul este de a facilita transportul CO_2 dinspre țesuturi spre organele excretoare, ca ioni bicarbonat (HCO_3^-) [34,35].

Izoenzima AC IV a fost evidențiată la nivelul sarcolemei fibrelor miocardului [36], a membranelor celulare din plămâni, rinichi [36-43], a celor din tractul gastro-intestinal [44,45] şi a hepatocitelor [46]. Studii laborioase asupra evidențierii izozimei AC IV au fost efectuate la nivelul epiteliului renal [36, 39] şi endoteliului capilarelor pulmonare [41,47].

Utilizarea inhibitorilor impermeabili pentru membrane [48] a demonstrat că enzima este localizată spre exteriorul celulei epiteliale tubulare a nefronului, în timp ce pentru celulele endoteliale capilare situsul activ este orientat spre partea luminală [49–52].

Recent, Sly şi colaboratorii [53] au demonstrat că atât izozima renală AC IV, cât şi cea endotelială capilară pulmonară sunt identice şi au masa molară M_r= 35000 Da.

Legătura izozimei AC IV de membrane este de tip fosfatidil-inozitol-glican. Izozima IV a fost purificată prin tehnica cromatografiei de afinitate şi prin gel-electroforeză pe SDS (sodiu dodecil sulfat) [42, 52].

Scanned with OKEN Scanner

Deşi iniţial s-a postulat ipoteza prezenţei în structura moleculei şi de resturi de zaharuri, studiile ulterioare au demonstrat existenţa unei structuri pure, proteice. În acest sens pledează faptul că preparatele enzimatice îşi menţin activitatea catalitică prin stocare, spre deosebire de preparatele anterioare, cu greutate molară 54-55 kDa, oarecum impure, care îşi pierd această proprietate în timp [53].

Spre deosebire de izozimele citoplasmatice, AC IV conţine şi resturi de cisteină printre aminoacizii care compun situsul său activ [42]. Izozima este de tip rapid, cu activitate catalitică mare, comparabilă cu AC II şi este susceptibilă la inhibiţia cu sulfonamide. Este însă total insensibilă la ionii halogenură şi pseudohalogenură [42-46].

Rolul izozimei este de a tampona rapid ionii HO^- sau H_3O^+, transportaţi prin epiteliile secretoare de electroliţi, prin catalizarea reacţiilor acestora în sistemul CO_2/HCO_3^-, reglând totodată accesul acestora prin membrane [37, 46, 53-56].

AC V, forma prezentă în mitocondrii, a fost izolată din mai multe ţesuturi, inclusiv din ficat*, precum şi din celule ale diverselor glande endocrine. Dodgson şi colaboratorii [26] au arătat că izozima AC V este prezentă sub forma solubilă în matricea mitocondrială, unde îndeplineşte rolul de sinteză a glucozei şi ureei (în hepatocite).

Din punct de vedere al intensităţii activităţii, acţiunea catalitică a izozimei AC V a fost evaluată ca fiind crescută [35], deşi nu se ştie încă precis dacă inhibiţia AC V implică răspunsuri fiziologice specifice [57].

AC VI este singura izozimă secretată a anhidrazei carbonice, fiind evidenţiabilă în saliva mai multor specii de animale şi având acţiune rapidă [58]. După Fernley [58], structura izozimei AC VI este de natură glicoproteică, cu o greutate molară de 42-45 kDa, care conţine în moleculă o singură legătură disulfidică cu rol stabilizator.

Izozima conţine 308 resturi de aminoacizi între care se pot identifica:

– o secvenţă conducătoare, tipică pentru proteinele secretate;

– secvenţe de aminoacizi conservate, care includ resturile de cisteină şi situsurile de *N*-glicosilare;

– secvenţe care sunt mult mai puţin conservate, din regiunile carboxiterminale.

Prin tehnici histochimice de hibridizare, Fernley a demonstrat că AC VI este sintetizată numai de către celulele acinare seroase ale glandelor salivare [58].

Datele deţinute până în prezent despre izozima AC VII sunt sărace. Se ştie că gena pentru AC VII este pe cromozomul 16, spre deosebire de izozimele AC I, II şi III care sunt localizate pe cromozomul somatic 8, iar pentru gena AC VI pe cromozomul 1. Izozima AC VII este, de asemenea, o izozimă citosolică, care însă nu are activitate catalitică de hidratare a dioxidului de carbon [18].

În afara celor şapte izozime de AC descoperite la vertebrate, se cunosc diverse subtipuri de AC izolate din alte surse – plante inferioare şi superioare – unde se pare că intervin în procesele de fotosinteză. Principala diferenţă faţă de izozimele izolate din vertebrate este de ordin structural, întrucât sunt formate din mai multe subunităţi identice (cu masa în jur de 30 kDa).

---

* La nivel hepatic, izozimele I-IV prezintă o distribuţie heterogenă [34].

Scanned with OKEN Scanner

Greutatea molară a tipurilor de AC izolate din plante este între 180-150 kDA, excepție făcând enzimele obținute din plantele monocotiledonate care, fiind forme neoligomere, au masa molară de 42-45 kDa [59]. Ca și enzimele din vertebrate, acestea au un ion de Zn(II) pe subunitatea proteică și au o activitate catalitică mare. Între enzimele izolate din cloroplaste și cele din citoplasma celulelor vertebratelor s-au decelat diferențe importante [18, 59]. Astfel, nu se observă omologie între secvențele de aminoacizi ale AC din cloroplastele plantelor superioare și AC din vertebrate. Totuși, enzima AC izolată din citoplasma algei verzi *Chlamydomonas reinhardtii* are o secvență de treisprezece resturi de aminoacizi identici cu secvența enzimei de același tip a mamiferelor [60]. Explicația furnizată de cercetători pentru o astfel de similitudine structurală chimico-biologică este în originea comună a enzimei din plante și animale. Așadar, după separarea plantelor de animale cu aproximativ 1,5 miliarde ani în urmă, enzima a evoluat structural, conservându-și însă principalele caracteristici (de notat că enzima din cloroplastele plantelor superioare a evoluat din cu totul alte proteine, activitățile lor similare fiind atribuite evoluției convergente [18].

De asemenea, AC a fost izolată și din diferite specii de eubacterii (*Eubacterium, Neisseria, Rhodospirillum, Serratia, Proteus*) și arhebacterii (*Methanosarcina, Desulfobacter, Desulfatomaculum*) [61-63]. În unele dintre acestea, enzima joacă un rol important în degradarea compușilor organici și formarea de metan (*Methanosarcina termophila*) [63]. Anhidraza carbonică izolată din *Methanosarcina termophila* este un homodimer cu masa molară 80kDa, care are o secvență de aminoacizi din situsul activ aproape identică cu cea a izozimelor izolate din mamifere [63]. Se pare așadar că gena primitivă a AC a apărut acum aproximativ 3 miliarde de ani [18].

Relativ recent, a fost izolată din surse murine o anhidrază carbonică mitocondrială AC Y [64], despre a cărei activitate catalitică se cunosc date relativ puține. AC Y are drept caracteristici comune cu proteinele mitocondriale următoarele:

– conținutul mare (30%) de Arg, Ser, Leu;
– o secvență marcată tipică (Arg în poziția 10);
– prezența unui aminoacid hidrofob în poziția 8;
– situarea în poziția 5 a Ser, Thr sau Gly.

2.2. Structura situsului activ al anhidrazei carbonice

Prin metoda cristalografiei cu raze X, au fost determinate și rafinate la rezoluție de 2Å structurile izozimelor AC I [65] și AC II umane [66] și a AC III bovină [67, 68].

Cele trei enzime citozolice au în comun forma generală a moleculelor și unele caracteristici esențiale ale situsurilor active [68]. Astfel, proteina are forma unui elipsoid, cu dimensiunile de 55/42/39 $Å^3$; scheletul polipeptidic este redat schematic în fig. 1 [66 – 68].

Scanned with OKEN Scanner

Catena polipeptidică a acestor proteine prezintă o împachetare specială, desemnată prin termenul „împachetare în nod" [69], care nu a mai fost observată pentru alte tipuri de proteine. Molecula conţine o parte însemnată de catene

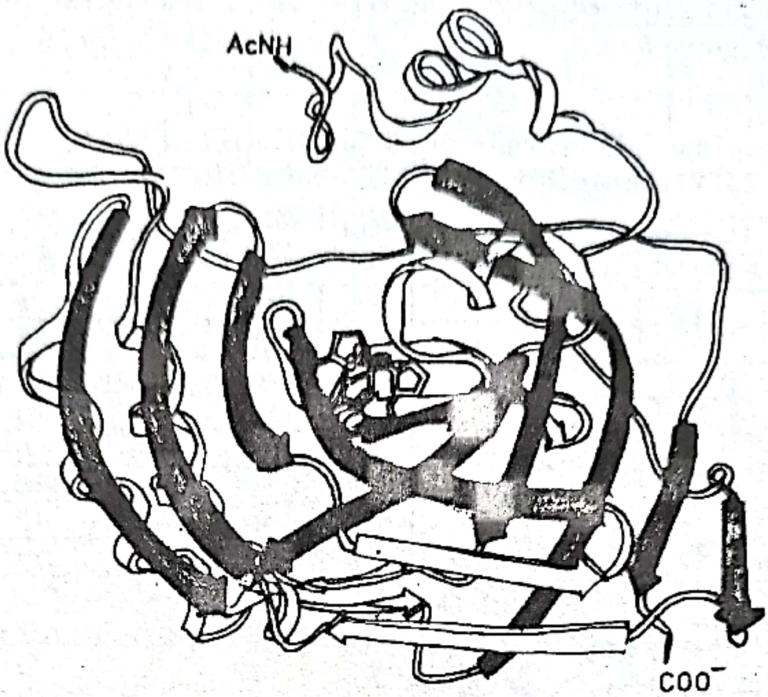


Fig. 1. Scheletul polipeptidic al izozimei AC II [68]; în centrul moleculei se observă ionul de Zn(II) şi cele trei nuclee imidazolice ale histidinelor coordinate.

polipeptidice în conformaţie β şi regiuni mai restrânse în forma de α-helix (în jur de 12%) [65]. Proteina este divizată în două părţi de o foaie β formată din zece lanţuri în conformaţie β, desemnate βA – βJ [67].

Partea inferioară conţine un miez hidrofob format din 34 resturi de aminoacizi, dintre care 10 sunt aromatici, („ciorchinele aromatic"), conservat în toate cele trei izozime citozolice [67]. Dintre aceste resturi, trei, şi anume Phe-93, Phe-95 şi Trp-97 sunt în contact cu liganzii ionului de zinc de la situsul activ al enzimei. Partea superioară a enzimei AC conţine situsul activ şi un buzunar hidrofob mai mic, reprezentând probabil situsul de legare a substratului (molecula CO_2). Resturile de aminoacizi aromatici din acest buzunar hidrofob sunt conservate în majoritatea tipurilor de AC şi implică resturi din regiunea amino-terminală (Trp-5, Tyr-7, Trp-16 şi Phe-20). Recent [68a,b] a fost evidenţiat un ciorchine de aminoacizi hidrofili la intrarea în situsul activ al izozimei II. Acest ciorchine de histidine include resturile: His-64, His-3, His-4, His-10, His-15 şi His-17 [68a,b]. Se presupune că activitatea catalitică extrem de eficientă a acestei izozime este datorată acestei structuri particulare a situsului său activ, care are ca urmare facilitarea etapei determinante de viteză a procesului catalitic, care este un transfer de protoni. Resturile imidazolice ale histidinelor prezente doar în această izozimă în această conformaţie favorabilă constituie de fapt excelente grupări de

inv. 150951

Scanned with OKEN Scanner

navetare a protonilor între situsul activ şi mediul de reacţie, datorită valorilor lor pK_a în domeniul 5-7 [68a,b].

Situsul activ al AC are forma conică, fiind o cavitate cu adâncimea de 15 Å şi lărgimea tot de 15 Å. La baza sa este plasat ionul de zinc. Structura chimică a situsului activ conţine într-o jumătate doar aminoacizi cu catena laterală hidrofobă, iar în cealaltă jumătate numai aminoacizi cu catena laterală hidrofilă [66, 68] (tabelul 1).

Tabelul 1

Aminoacizii constituenţi ai situsului activ pentru izozimele I-III, VI (AC I şi AC II umane; AC III bovină; AC VI umană). Datele pentru AC I-III din ref. [18], pentru AC VI din ref.[76]

Rest nr.	Partea hidrofilă				Rest nr.	Partea hidrofobă			
	AC I	AC II	AC III	AC VI		AC I	AC II	AC III	AC VI
7	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	91	Phe	Ile	Arg	Gln
62	Val	Asn	Asn	Asn	121	Ala	Val	Val	Val
64	His	His	Lys	His	131	Leu	Phe	Phe	Tyr
67	His	Asn	Arg	Gln	135	Ala	Val	Leu	Gln
92	Gln	Gln	Gln	Gln	143	Val	Val	Val	Val
106	Glu	Glu	Glu	Glu	198	Leu	Leu	Phe	Leu
199	Thr	Thr	Thr	Thr	207	Val	Val	Ile	Val
200	His	Thr	Thr	Thr	209	Trp	Trp	Trp	Trp

Ionul de zinc, Zn(II) este coordinat cu resturile de imidazol ale His-94, His-96 şi His-119, după cum este redat în fig. 2.

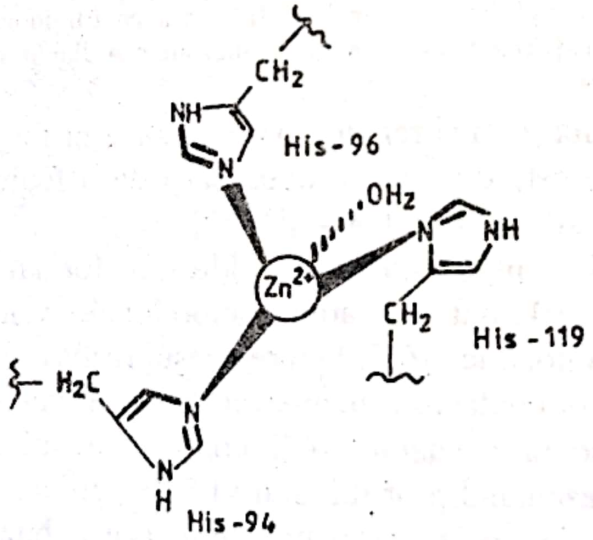


Fig. 2. Coordinarea ionului Zn(II) în situsul activ al AC.

Menţionăm că în timp ce His-94 şi His-96 coordinează prin atomul de azot ε-N, His-119 coordinează prin δ-N. Al patrulea ligand al ionului de zinc este o moleculă de apă sau un ion de hidroxid [66-68]. Geometria ionului de Zn (II) este foarte apropiată de cea a unui tetraedru regulat, după cum reiese şi din datele tabelului 2, unde sunt prezentate valorile determinate (prin cristalografie de raze X) pentru unghiurile şi distanţele dintre acest ion şi atomii coordinaţi ai liganzilor [66].

Scanned with OKEN Scanner

navetare a protonilor între situsul activ şi mediul de reacţie, datorită valorilor lor pK_a în domeniul 5-7 [68a,b].

Situsul activ al AC are forma conică, fiind o cavitate cu adâncimea de 15 Å şi lărgimea tot de 15 Å. La baza sa este plasat ionul de zinc. Structura chimică a situsului activ conţine într-o jumătate doar aminoacizi cu catena laterală hidrofobă, iar în cealaltă jumătate numai aminoacizi cu catena laterală hidrofilă [66, 68] (tabelul 1).

Tabelul 1

Aminoacizii constituenţi ai situsului activ pentru izozimele I-III, VI (AC I şi AC II umane; AC III bovină; AC VI umană). Datele pentru AC I-III din ref. [18], pentru AC VI din ref.[76]

Rest nr.	Partea hidrofilă				Rest nr.	Partea hidrofobă			
	AC I	AC II	AC III	AC VI		AC I	AC II	AC III	AC VI
7	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	91	Phe	Ile	Arg	Gln
62	Val	Asn	Asn	Asn	121	Ala	Val	Val	Val
64	His	His	Lys	His	131	Leu	Phe	Phe	Tyr
67	His	Asn	Arg	Gln	135	Ala	Val	Leu	Gln
92	Gln	Gln	Gln	Gln	143	Val	Val	Val	Val
106	Glu	Glu	Glu	Glu	198	Leu	Leu	Phe	Leu
199	Thr	Thr	Thr	Thr	207	Val	Val	Ile	Val
200	His	Thr	Thr	Thr	209	Trp	Trp	Trp	Trp

Ionul de zinc, Zn(II) este coordinat cu resturile de imidazol ale His-94, His-96 şi His-119, după cum este redat în fig. 2.

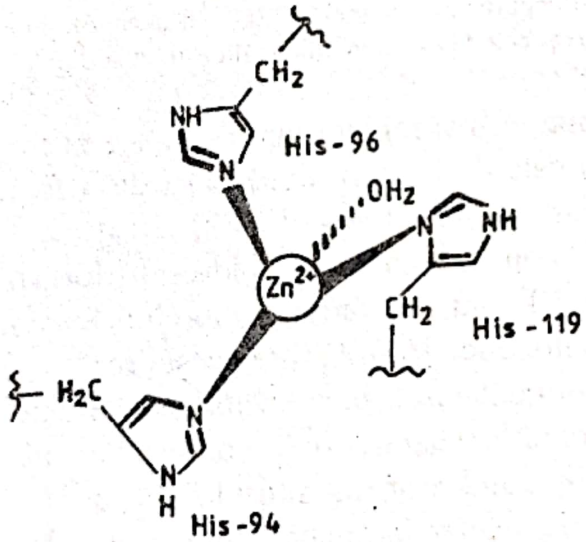


Fig. 2. Coordinarea ionului Zn(II) în situsul activ al AC.

Menţionăm că în timp ce His-94 şi His-96 coordinează prin atomul de azot ε-N, His-119 coordinează prin δ-N. Al patrulea ligand al ionului de zinc este o moleculă de apă sau un ion de hidroxid [66-68]. Geometria ionului de Zn (II) este foarte apropiată de cea a unui tetraedru regulat, după cum reiese şi din datele tabelului 2, unde sunt prezentate valorile determinate (prin cristalografie de raze X) pentru unghiurile şi distanţele dintre acest ion şi atomii coordinaţi ai liganzilor [66].

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Geometria ionului de Zn(II) în situsul activ al izozimei AC II umane

Atomul coordinat (X)	Distanța (A)	Unghiul (°)		
		X-Zn-His-94	X-Zn-His-96	X-Zn-His-119
H_2O	2,1	108	114	113
N-ε-2 (His-94)	2,0	-	107	114
N-ε-2 (His-96)	2,1	-	-	102
N-δ-1 (His-119)	1,9	-	-	-

Structura schematică a situsului activ pentru izozimele AC II şi AC III este reprezentată în fig. 3.

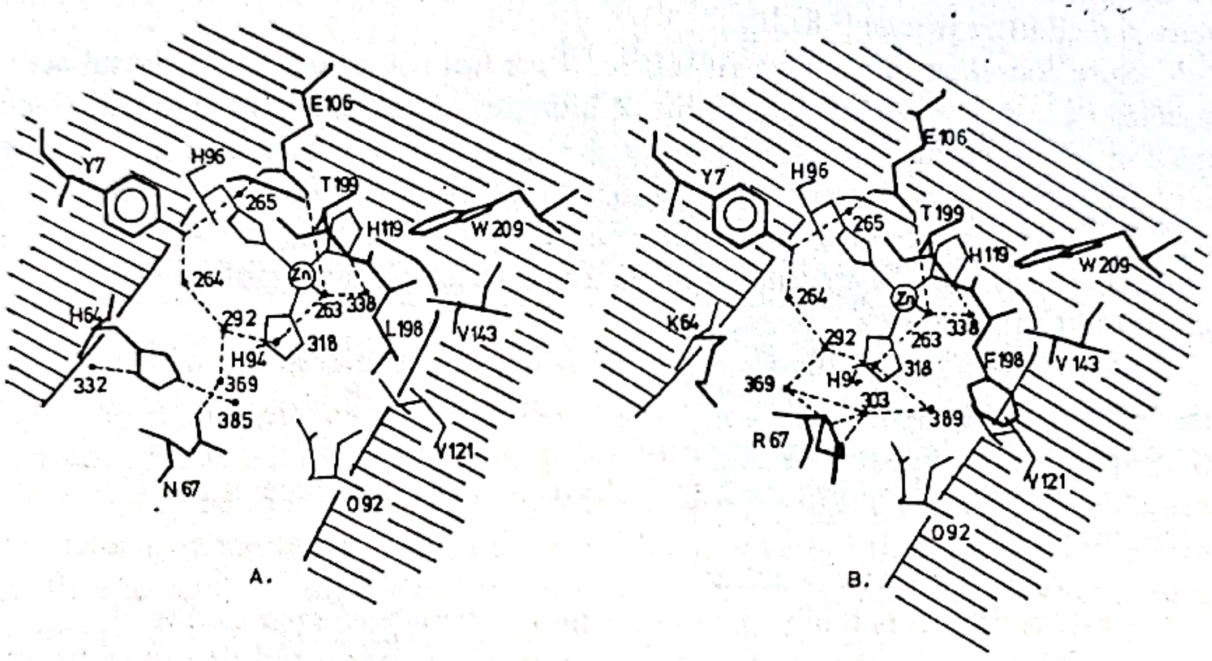


Fig. 3. Reprezentarea schematică a situsului activ al izozimelor AC II (umană) (A.) şi respectiv AC III (bovină) (B.).Pentru (A.) au fost identificate 9 molecule de apă în situsul activ, apa coordinată de Zn(II) fiind numerotată 263 şi formând trei legături de hidrogen cu resturi de aminoacizi din situs; pentru (B.) au fost identificate 8 molecule de apă în situsul activ [68].

Conformaţia celor trei histidine legate de ionul de zinc este foarte stabilă, nemodificabilă prin legarea inhibitorilor sau substraturilor enzimei [66]. Acest fapt se datorează implicării resturilor imidazolice în legături de hidrogen suplimentare: N-δ din His-94 cu atomul de oxigen carbonilic din Gln-92; N-δ din His-96 cu atomul de oxigen din Asn-244 şi N-ε din His-119 cu O-ε-2 al restului Glu-117.

Cele mai importante resturi de aminoacizi din partea hidrofilă a situsului activ sunt cele din poziţiile:

– 64: His în AC I şi II, respectiv Lys în AC III;

– 199: Thr, prezent în toate cele trei izozime;

– 200: His în AC I şi Thr în AC II, respectiv AC III (vezi tabel 1).

Acestea participă la constituirea reţelelor de legături de hidrogen prin intermediul moleculelor de apă prezente în cavitate. Pentru izozima AC II au fost

Scanned with OKEN Scanner

identificate opt molecule de apă (în afara celei coordinate de ionul de zinc [68], iar pentru AC III încă şapte molecule de apă [67, 68]. Astfel, apa legată de ionul de Zn(II) este conectată prin legături de hidrogen cu atomul de oxigen γ_1 al restului Thr-199 (prezent în toate cele trei izozime), care la rândul său este legat de gruparea carboxil a restului Glu-106. Acest ultim rest este practic îngropat în spatele ionului de zinc din moleculă. Restul glutamat participă la trei legături de hidrogen [68].

O importantă critică pentru izozima AC II o prezintă restul His-64 (vezi şi secţiunile 2.3 şi 3) şi ciorchinele de histidine [68a,b] menţionat anterior din care aceasta face parte, întrucât reprezintă naveta de protoni a enzimei. Atomii de azot imidazolici ai acestor resturi de aminoacizi situaţi la intrarea situsului activ, participă la realizarea legăturilor de hidrogen cu moleculele de apă prezente în cavitate, jucând apoi un rol important în procesele de transfer a H^+ între situsul activ şi mediul de reacţie [68a,b].

Spre deosebire de izozima AC II, AC I are trei resturi de His în situsul activ (tabelul 1), astfel că reţeaua legăturilor de hidrogen şi aranjamentul moleculelor de apă sunt diferite. Aceste resturi sunt însă dispuse într-un mod care nu permite navetarea eficientă a protonilor între situsul activ şi mediul de reacţie, ceea ce ar explica activitatea catalitică mult mai redusă (10 %) a acestei izozime, comparativ cu AC II [68a]. Până în prezent, nu se cunoaşte exact numărul moleculelor de apă din situsul activ al acestei izozime [65].

Izozima AC III posedă trei resturi de aminoacizi bazici în situsul activ: Lys-64; Arg-67 şi Arg-91. După cum se va vedea în secţiunea 2.3., această izozimă are unele caracteristici unice în raport cu diferitele izozime ale AC:

– este cea mai puţin activă (1% din activitatea catalitică a AC II) pentru hidratarea CO_2;

– are activitate de fosfatază acidă;

– este rezistentă la inhibiţia cu sulfonamide aromatice/heterociclice.

Aceste particularităţi pot fi corelate cu prezenţa unor astfel de resturi bazice în situsul activ, care este oarecum mai îngust decât al izozimelor precedente [67, 68] (Fig. 3B).

2.3 Aspecte cinetice şi termodinamice ale reacţiilor catalizate de anhidraza carbonică

Reacţia cea mai simplă pe care o catalizează diferitele izozime ale AC este hidratarea reversibilă a dioxidului de carbon la bicarbonat şi ioni de hidrogen:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Reacţia (1) decurge după o cinetică simplă Michaelis-Menten, indiferent de tipul sau sursa izozimei care acţionează drept catalizator [70,71]:

$$v = \frac{[S]\cdot[E_0]}{K_m + [S]} \qquad (3)$$

Scanned with OKEN Scanner

$$v_{max} = k_{cat} \cdot E_0 \qquad (4)$$

unde: v = viteza reacției de hidratare;
$[S]$ = concentrația substratului – CO_2;
$[E_0]$ = concentrația totală de enzimă;
K_m = constanta Michaelis-Menten;
v_{max} = viteza maximă a reacției catalizate;
k_{cat} = numărul de turnover (constanta cinetică pentru reacția de pseudo ordinul I).

Studii cinetice detaliate s-au efectuat doar cu izozimele I-III, iar câteva valori ale parametrilor anterior menționați, determinați în condiții de stare staționară pentru aceste izozime, sunt redați în tabelul 3.

Tabelul 3

Valori ale parametrilor cinetici și termodinamici pentru hidratarea CO_2 cu izozimele I-III ale AC

Izozima	Sursa	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/Km ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	pK_a^*	Ref.
AC I	umană	2 . 105	$5 . 10^7$	7,1	[72a,b]
AC II	umană	1,4 . 106	$1,4 . 10^8$	7,0	[72a]
AC III	felină	1 . 104	$3 . 10^5$	5, 5	[73]

* Valoarea pK_a a apei coordinate de ionul de Zn(II) din situsul activ.

Comparând datele tabelului rezultă că izozima AC II este unul dintre cei mai buni catalizatori existenți în natură, putând fi caracterizată ca o proteină perfect evoluată [74], pe când izozima AC I are o eficacitate mai slabă. De aici și divizarea diferitelor izozime în: rapide (de tipul AC II) și lente (de tipul AC I). Izoenzima AC III este catalizatorul cel mai puțin eficient, caracterizându-se printr-o activitate de aproximativ 100 de ori mai slabă decât a izozimei AC II.

Constanta k_{cat} pentru hidratarea CO_2 catalizată de izozima AC II prezintă dependența de pH (Fig. 4), care se poate considera că aproximează o curbă de titrare simplă, cu un pK_a în jur de 7 a grupării responsabile pentru activitatea catalitică [71,75].

Deși lipsesc determinări cinetice de precizie pentru activitatea altor izozime, este cunoscut faptul că AC IV, AC VI și AC VII sunt izozime rapide, comparabile ca activitate cu izozima AC II pentru reacția de hidratare a CO_2 [53,76].

Izoenzimele AC catalizează și reacțiile de hidroliză a esterilor. Activitatea esterazică a AC a fost descoperită de Schneider și Lieflander [77] asupra 4-nitrofenilacetatului și independent de Tashian [78], asupra esterilor alifatici C_2 – C_4 ai β- naftolului:

$$R\text{-}COOAr + H_2O \rightleftharpoons R\text{-}COOH + Ar\text{-}OH \qquad (5)$$

Prin cercetarea reacției de hidroliză a 4-nitrofenilacetatului pentru izozima AC I umană, s-a determinat constanta Michaelis K_M = 5 mM [79,80]. Deși acțiunea esterazică este similară hidratării CO_2 din mai multe puncte de vedere, turnoverul

Scanned with OKEN Scanner

este mult mai mic (doar 13 s^{-1}) [16], comparativ cu turnoverul de hidratare al CO_2. Ca şi hidratarea CO_2, hidroliza esterilor este inhibată de sulfonamide sau anioni, inhibitori tipici ai AC [16].

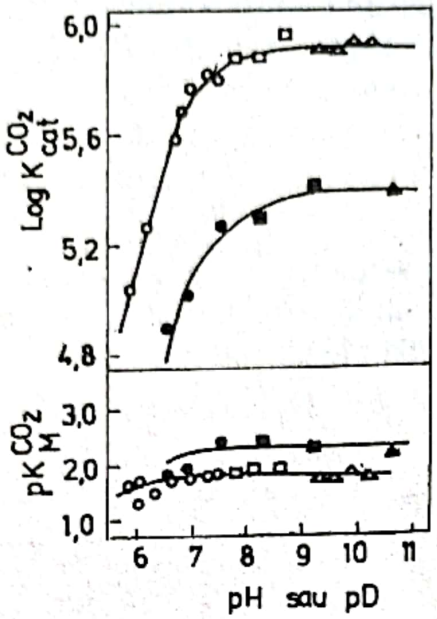


Fig. 4. Dependența de pH (pD) a constantelor cinetice (k_{cat}) şi respectiv constantei Michaelis (K_M) la reacția de hidratare a CO_2 catalizată de AC II bovină, în apă (simboluri deschise) şi respectiv D_2O (simboluri închise), la 25 °C; tampoane utilizate: fosfat (o); 1,2-dimetilimidazol (□); N,N-dimetilglicina (Δ) (adaptată din ref. [71]).

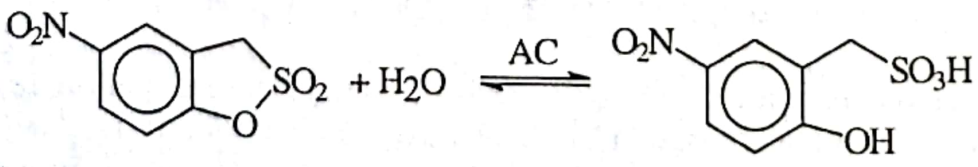
Recent, s-a raportat [81] că izozima bovină AC II hidrolizează enantioselectiv esterii metilici ai acizilor mandelici 4-substituiți sau 3,4-disubstituiți (cu grupări halogen, metoxi etc). Enantiomerii R sunt substraturi mai bune comparativ cu cei S; valorile enantiomerice de exces fiind însă moderate, de 40-51% [81].

O altă reacție catalizată de AC este hidratarea reversibilă a aldehidelor [82]:

$$R\text{-}CHO + H_2O \rightleftharpoons R\text{-}CH(OH)_2 \qquad (6)$$

Izozima umană AC II se supune unei cinetici Michaelis-Menten pentru hidratarea acetaldehidei, cu K_M = 0,65 mM. Turnover-ul este, de asemenea, mai mic decât cel al hidratării CO_2, fiind aproximat la 870 s^{-1} [82]. În afara aldehidelor alifatice, AC catalizează şi hidratarea aldehidelor heterociclice, ca de exemplu piridin-carbaldehidele [82c]. Aceste substraturi sunt oarecum anormale, deoarece atomul de azot piridinic poate complexa direct la ionul de Zn (II) din situsul activ, ceea ce ar explica afinitatea mare pentru substrat (K_M = 14 mM) în cazul piridin-2-carbaldehidei [82c].

Izozimele AC I şi AC II pot de asemenea hidroliza sultone [83]:



(7)

Scanned with OKEN Scanner

Deşi nu s-au determinat date cinetice precise pentru această reacţie, turnoverul este apreciat ca fiind mic, comparativ cu alte reacţii catalizate de AC.

Izozima AC III diferă de celelalte forme ale AC nu numai prin faptul că este cea mai lentă şi mai rezistentă la inhibiţia cu sulfonamide (vezi cap. 4.2), dar are şi o activitate catalitică suplimentară, întrucât poate funcţiona ca fosfatază acidă [30, 84]. Singurul substrat al AC III descoperit până în prezent este 4-nitrofenilfosfatul [84]:

$$R\text{-}OPO_3^{2-} + H_2O \rightleftharpoons R\text{-}OH + HPO_4^{2-} \quad (R = 4\text{-}(O_2N)\text{-}C_6H_4^-) \qquad (8)$$

Constanta Michaelis pentru reacţia (8) este K_M = 2,8 mM [84], iar ca o particularitate a reacţiei este ca dependenţa de pH a activităţii fosfatazice este foarte îngustă. Optimul activităţii catalitice în această reacţie este la pH = 5,3 , iar sub pH = 4,8 sau peste pH = 6,8 activitatea fosfatazică tinde spre zero [84]. Această dependenţă este mult diferită faţă de cea a activităţii esterazice (a tuturor izozimelor AC), care este sigmoidală, optimul fiind pentru un platou larg de valori ale pH-ului [71, 84]. De menţionat, că un element încă neexplicat, ca acetazolamida (cel mai puternic inhibitor de AC) în concentraţii similare nu inhibă activitatea fosfatazică, la pH-ul optim de 5,3 [84]. Pullan şi Noltmann [84] consideră că fosfaţii se leagă în alt situs decât CO_2, probabil în vecinătatea resturilor Arg-91 şi Lys-64. Aşa cum reiese şi din tabelul 1, AC III este singura izozimă care are o proporţie însemnată de aminoacizi bazici în situsul activ. Aceste resturi bazice de aminoacizi şi faptul că situsul activ al AC III este mai îngust decât al AC II, ar explica atât eficienţa mai mică a acestei izozime la hidratarea CO_2, cât şi rezistenţa la inhibiţia cu sulfonamide aromatice şi heterociclice [30,84].

Au fost de asemenea raportate următoarele tipuri de reacţii în care participă anhidraza carbonică [84a,b]: hidroliza unor derivaţi halogenaţi, cum ar fi 2,4-dinitrofluorobenzenul (reacţia 9); cloroformiatul de benzil (reacţia 10) sau alchil/aril-sulfonil clorurile (reacţia 11):

$$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH \quad (Ar = 2,4\text{-dinitrofenil}) \qquad (9)$$

$$PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl \qquad (10)$$

$$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl \quad (R = Me; Ph) \qquad (11)$$

AC este de asemenea implicată în sinteza acidului carbamic din CO_2 şi amoniac (reacţia 12) precum şi a bicarbonatului de amoniu (reacţia 13). Mecanismul catalitic al reacţiilor sus-menţionate (de tipul 9–13) este însă pentru moment puţin investigat. De menţionat însă că nici o izozimă a AC are activitate peptidazică (reacţii de tipul 14 *nu* sunt catalizate de AC) [84a,b]:

$$CO_2 + NH_3 \rightleftharpoons H_2NCOOH \qquad (12)$$

Scanned with OKEN Scanner

$$CO_2 + NH_3 + H_2O \rightleftharpoons NH_4^+HCO_3^- \quad (13)$$

$$RCONHR' + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + H_2NR' \quad (14)$$

Recent a fost evidențiat faptul că cianatul [84a] și cianamida [84b], molecule/ioni izoelectronici și izostructurali cu substratul fiziologic al enzimei – dioxidul de carbon – acționează nu numai ca inhibitori ai AC, dar și ca substraturi sinucigașe (*suicide substrates*), hidratându-se după legarea în situsul activ la carbamat și respectiv uree (reacțiile 15 și 16), care rămân coordinate la ionul metalic din enzimă, blocând ulterioare procese catalitice la care aceasta ar putea participa [84a,b]:

$$CNO^- + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOO^- \quad (15)$$

$$H_2NCN + + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2 \quad (16)$$

Aceste reacții au fost studiate în mod detaliat prin metode spectroscopice și de cristalografie de raze X, care au permis evidențierea modului de legare a produsului de reacție în situsul activ al enzimei [84a,b] (Fig. 4A).

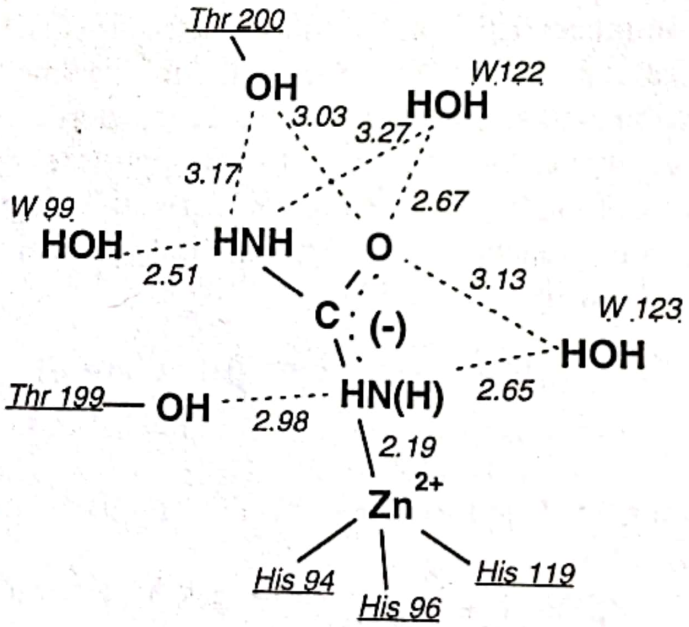


Fig. 4A. Ureea (sau ionul ureat) legată în situsul activ al izozimei AC II, după hidratarea cianamidei de către enzima conform reacției 16 (cf. structurii de raze X raportată de Briganti et al. [84b]). Inhibitorul este fixat în situsul activ prin intermediul legăturii coordinative cu ionul metalic și a unei rețele de opt legături de hidrogen extrem de puternice.

Scanned with OKEN Scanner

3. MECANISMUL CATALITIC AL ANHIDRAZEI CARBONICE

Mecanismul catalitic al anhidrazei carbonice este cunoscut în detaliu, în special prin studiile efectuate asupra izozimei AC II native sau substituite cu diferiți ioni metalici [85, 86]. Ionul de Zn(II) prezent în enzimă este vital pentru activitatea catalitică a acesteia, întrucât apoenzima este total lipsită de activitate [9,15].

Studiile lui Lindskog, Scozzafava şi Bertini [85, 86] pe enzime substituite cu Co(II) au evidențiat existența unor forme „acidă" şi „bazică" ale enzimei în funcție de ligandul ionului metalic din situsul activ, care poate fi o moleculă de apă (forma acidă, $EZnOH_2$) şi respectiv un ion hidroxil (forma bazică, EZnOH).

Deşi a existat o controversă îndelungată [71, 87] asupra naturii speciei active a acestei enzime, actualmente este general acceptat [71] ca un ion HO^- coordinat de Zn(II) (sau de alt ion metalic în enzimele substituite) reprezintă reactantul nucleofil care atacă substratul (CO_2), transformându-l în bicarbonat. Modelul simplificat al acestui mecanism catalitic, de tip „ping-pong", poate fi schematizat astfel (reacțiile 17 şi 18):

$$EZn^{2+} - {}^{-}OH \underset{-CO_2}{\overset{+CO_2}{\rightleftharpoons}} EZn^{2+}(HO^-)\ldots CO_2 \rightleftharpoons$$

$$EZn^{2+} - HCO^-_3 \underset{-H_2O}{\overset{+H_2O}{\rightleftharpoons}} EZn^{2+} - OH_2 + HCO^-_3 \qquad (17)$$

$$EZn^{2+} - {}^{-}OH_2 \rightleftharpoons EZn^{2+} - {}^{-}OH + H^+ \qquad (18)$$

Într-o primă etapă, reacția (17), are loc atacul nucleofil al ionului hidroxil cu formarea bicarbonatului coordinat la ionul de Zn(II). Ulterior, acesta este substituit de către o moleculă de apă, cu generarea formei acide a enzimei, inactivă catalitic. Reacția continuă prin transferul unui proton [reacția (18)] de la apa coordinată de zinc spre mediul de reacție, cu regenerarea speciei active (bazice) a enzimei.

Problema principală a mecanismului redat în ecuațiile anterioare – 17 şi 18 – este aceea că nu explică eficiența deosebită a catalizei. Aceasta deoarece apa coordinată de Zn(II) are valoarea $pK_a = 7$ (tabelul 3) şi, luând în considerare limitările impuse de difuzia protonilor în mediul de reacție, ar rezulta conform calculelor lui Silverman şi Lindskog [71] că turnoverul maxim al acestei reacții este de $10^3\ s^{-1}$. Comparând această valoare calculată cu datele tabelului 3, AC II este practic de 1000 de ori mai eficace. Studii cinetice aprofundate [88, 89] au demonstrat însă că molecule cu proprietăți tampon prezente în soluție sau chiar resturi de aminoacizi din situsul activ al enzimei pot asista la etapa de transfer al

Scanned with OKEN Scanner

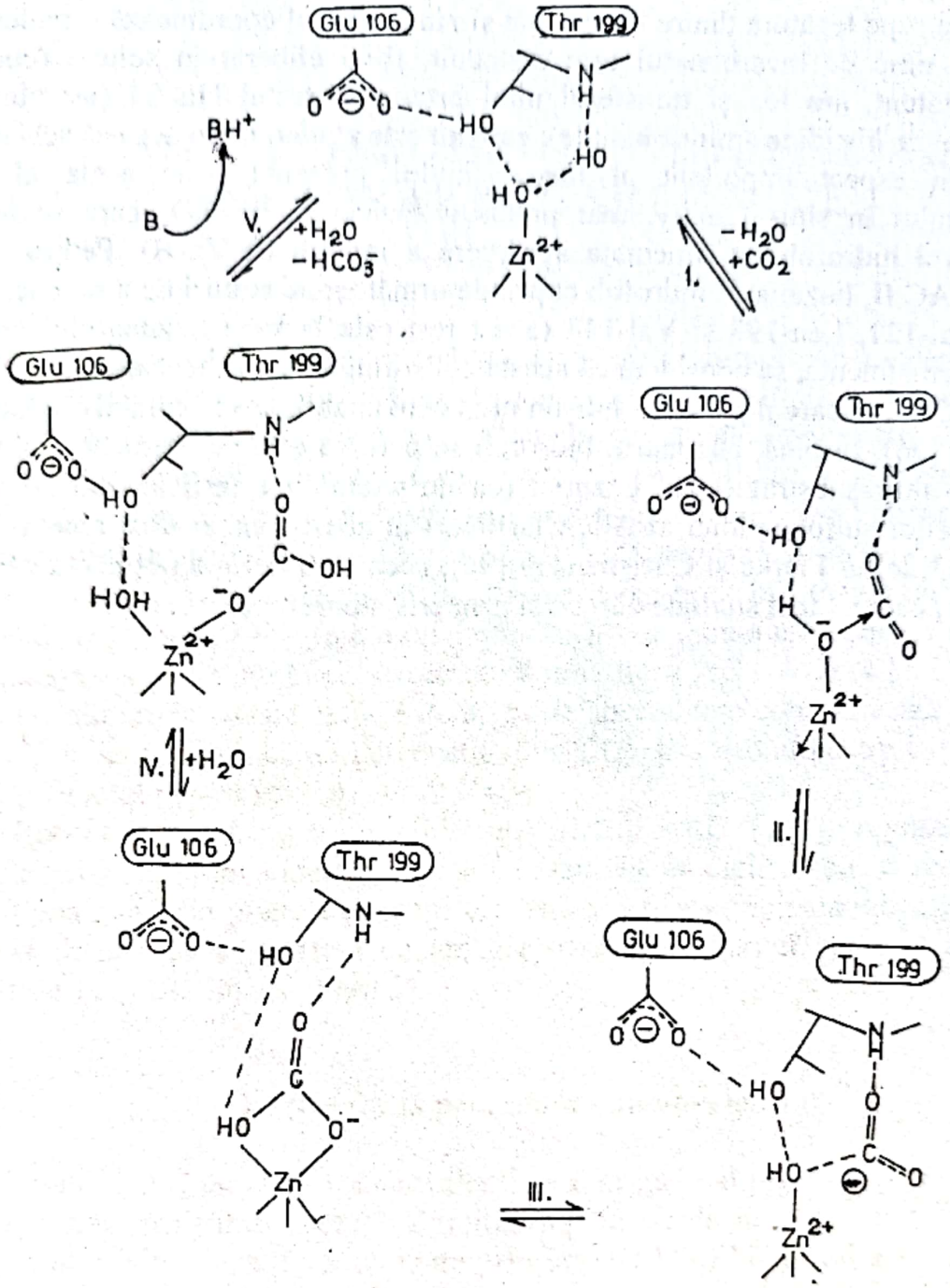
protonului (reacţia 18), care este determinantă de viteză pentru întregul proces catalitic [68a,b,71]. Practic, a doua ecuaţie a mecanismului catalitic devine:

$$EZn^{2+} - OH_2 \; + \; B \rightleftharpoons EZn^{2+} - {}^{-}OH \; + \; BH^{+} \qquad (19)$$

În ecuaţia (19), transferul protonului se poate realiza atât intermolecular – prin intermediul unor specii prezente în mediul de reacţie, capabile de a-l accepta – cât şi intramolecular. Această ultimă variantă a fost propusă iniţial de Silverman şi colab. [90] pentru a explica efectul izotopic cinetic mare (3,8) observat asupra k_{cat} când se utilizează D_2O drept solvent. Existenţa efectului izotopic sus-menţionat indică faptul că transferul protonului în timpul catalizei este realmente un proces intramolecular. De fapt, în aceste experimente [90] s-a lucrat la concentraţii mari de tampon, pentru a se elimina implicaţiile asupra vitezei de reacţie create de transferul intermolecular de H^+ [71]. Pornind de la structura cunoscută a situsului activ al AC II [66,68] (secţiunea 2.2.) s-a emis ipoteza că His-64 este un posibil factor pentru a transporta protoni între situsul activ şi mediul de reacţie. Studiile RMN au permis determinarea valorii de 7,1 a pK_a-ului restului imidazolic al acestui aminoacid [91]. Astăzi, este unanim admis că restul imidazolic His-64, situat la 6 Å de ionul de Zn(II) [68], este transportul de protoni al AC II [71]. Acest rest are o mobilitate relativ mare [91] şi este conectat prin mai multe legături de hidrogen cu apa coordinată la ionul de zinc. În acest sens, experienţele de simulare pe computer [92, 93] au demonstrat prin calcule că reţeaua de legături de hidrogen este importantă la realizarea procesului de transfer al protonului (dar aceste studii nu au fost confirmate prin experienţe ulterioare de cristalografie de raze X şi mutageneza direcţionată). De fapt, studiile lui Merz sus-menţionate [92] nu au adus nici un aport la înţelegerea în detaliu al mecanismului catalitic al acestei enzime.

Dovezi suplimentare în sprijinul ipotezei funcţionării His-64 ca transport de protoni au fost furnizate de către Tu şi colab., care au descoperit că, în concentraţii micromolare, ionii Cu^{2+} şi Hg^{2+} inhibă transport de protoni a AC, ca urmare a legării de restul imidazolic al His-64. Ulterior, această legare a fost demonstrată prin cristalografie de raze X, de către grupul lui Liljas [95]. Practic, pe harta densităţii electronice a complexului AC II cu ioni mercurici, se observă că ionii Hg^{2+} pot coordina atât la atomul de azot N-δ_2, cât şi la N-ε_2 din His-64 [68,95]. Recent, Briganti şi colab. [68a,b] au demonstrat că eficienţa deosebită ca şi catalizator al izozimei AC II este de fapt determinată de prezenţa unui ciorchine de 6 histidine prezente la intrarea situsului activ (ciorchine din care face parte şi His 64), cu un rol activ în transferul de protoni între situsul activ şi mediul de reacţie. Alte izozime mai puţin active, ca de exemplu AC I sau AC III, nu posedă deloc un astfel de cluster (cazul izozimei lente AC I) sau îl posedă doar pe jumătate, lipsind însă partea critică care implică restul His-64 (izozima din muşchi, AC III, care are o lizină la poziţia 64, având însă un semiciorchine exterior de histidine, care posedă o eficienţă slabă în procesele de transfer de protoni amintite mai sus) [68a].

Scanned with OKEN Scanner



Schema 1

Mecanismul descris este redat detaliat în schema 1, unde sunt evidențiate și resturile Glu-106 și Thr-199 din situsul activ. Acestea participă la interacțiuni prin legături de hidrogen cu molecula de apă coordinată la Zn(II) și/sau cu substraturile/inhibitorii enzimei [68].

În prima etapă (I), CO_2 se fixează la situsul activ (în buzunarul hidrofob), dislocuind o moleculă de apă, pentru ca în etapa a doua să se producă atacul nucleofil al ionului HO^- legat de zinc. Se formează bicarbonat coordinat (etapa III), în care zincul este pentacoordinat, iar gruparea C=O a bicarbonatului formează o legătură de hidrogen cu gruparea NH din Thr-199. În penultima etapă, cea de-a

Scanned with OKEN Scanner

patra, se rupe legătura dintre bicarbonat şi zinc, ultimul coordinează o moleculă de apă, în timp ce bicarbonatul este dislocuit, fiind eliberat în soluție (etapa V). Concomitent, are loc şi transferul unui proton la restul His-64 (iar ulterior la clusterul de histidine amintit înainte), care nu este evidențiat în această schemă.

Un aspect important al mecanismului prezentat este acela al legării substratului în situsul activ, mai precis a moleculei de CO_2 care se leagă în buzunarul hidrofob din imediata apropiere a ionului de Zn(II). Pentru izozima umană AC II, buzunarul hidrofob cuprinde următoarele resturi de aminoacizi: Trp-209, Val-121, Leu-198 şi Val-143 (acest rest este la baza buzunarului hidrofob) [96]. Actualmente, se consideră că acesta constituie un situs de asociere precatalitic pentru CO_2, pe care îl plasează într-un mod convenabil, la aproximativ 3 Å de ionul de zinc [96]. În plus, buzunarul hidrofob se pare că este de asemenea implicat în legarea altor substraturi ale enzimei (ca de exemplu esterii aromatici), ca şi a inhibitorilor sulfonamidici ai AC. Clarificări în acest sens au fost recent obținute prin studiile lui Fierke şi Christianson [96], ceea ce a permis obținerea de enzime mutante, care au fost studiate cinetic şi prin cristalografie de raze X.

Scanned with OKEN Scanner

4. MECANISMUL DE INHIBIȚIE AL ANHIDRAZEI CARBONICE

Principalele două clase de inhibitori ai AC, anionii monovalenți [97] și sulfonamidele nesubstituite [10], au fost descoperite în 1940 de către Mann și Keilin. Aceşti compuşi, deşi prezintă deosebiri structurale importante, din punctul de vedere al cineticii de inhibiție se comportă ca inhibitori non-competitivi cu substratul CO_2 (sau *p*-nitrofenil-acetatul) atât pentru activitatea hidratazică cât și cea esterazică a enzimei [98-102]. În acest sens, pledează și faptul că inhibitorii aparținând acestor clase, se leagă la situsuri diferite de buzunarul hidrofob care constituie regiunea de legare a dioxidului de carbon (sau a esterilor) la enzimă. În general s-a constatat, cu unele excepții, că inhibitorii AC (IAC) se leagă direct de ionul metalic de la situsul activ. Literatura de specialitate consemnează că până în prezent, se cunosc ca inhibitori competitivi cu CO_2, imidazolul pentru izozima AC I [72a] și fenolul pentru izozima AC II [103].

Recent au fost raportați inhibitori duali ai AC [104], reprezentați prin complecși ai sulfonamidelor aromatice sau heterociclice cu diverși cationi tranziționali sau din grupele principale. Caracteristica principală a acestora constă în posibilitatea de a interfera cu ambele etape ale ciclului catalitic al enzimei (ecuațiile 17 și 18, din secțiunea 3).

4.1. Inhibiția prin anioni monovalenți

Inhibiția AC cu anioni monovalenți este în general reversibilă [86d] (unicul inhibitor non-reversibil, ureea, va fi discutat la finele acestui capitol). Legarea inhibitorului (simbolizat în continuare prin In^- sau HIn) la situsul activ al enzimei este dependentă de pH datorită faptului că enzima există sub două forme, cea acidă și cea bazică, care sunt în echilibru conform reacției 18:

$$E\text{-}Zn^{2+}\text{-}OH_2 \rightleftharpoons E\text{-}Zn^{2+}\text{-}OH^- + H^+$$

Pe de altă parte, inhibitorul posedă o aciditate intrinsecă, descrisă prin ec. 20:

$$HIn \rightleftharpoons In^- + H^+ \qquad (20)$$

Echilibrul (18) este caracterizat de constanta pK_{aEnz} (care pentru izozima AC II are valoarea 7). Pentru reacția (20) este specifică constanta de aciditate a inhibitorului, pK_{aIn}.

Scanned with OKEN Scanner

Comparând dependența de pH a legării diferiților inhibitori anionici în situsul activ al AC, Coleman [105] propune următoarea schemă de desfășurare a proceselor, descrise prin ecuațiile 21 și 22 redate mai jos:

$$EZn^{2+} - OH_2 + HIn \rightleftharpoons EZn^{2+} - In^- + H_2O + H^+ \quad (21)$$

$$\downarrow\uparrow -H^+ \qquad \downarrow\uparrow -H^+$$

$$EZn^{2+} - {}^-OH + In^- \rightleftharpoons EZn^{2+} - In^- + HO^- \quad (22)$$

Conform modelului lui Coleman [105], inhibitorul în forma acidă (HIn) se leagă de forma acidă a enzimei (ec. 21), cu transferul unui proton și eliminarea unei molecule de apă, sau, alternativ, inhibitorul în forma anionică (In^-) se leagă de forma bazică a enzimei, prin dislocuirea ionului hidroxil legat de zinc (ec. 22). Acest model este actualmente depășit, fiind prezentat aici doar pentru importanța sa istorică.

Date experimentale obținute din măsurători de constante aparente de afinitate (K_{ap}) ale diverșilor inhibitori pentru enzima (raportate de Lindskog și Thorslund [106], și respectiv, de Pocker și Stone [107]) au demonstrat însă, că fenomenele care au loc la legarea inhibitorului sunt mai complicate și impun a se lua în considerare următoarele mărimi:

a) Constanta aparentă de afinitate a inhibitorului pentru enzimă:

$$K_{ap} = K_I / (1 + K_{aEnz} / [H^+]) \quad (23)$$

b) Constanta inhibitorului (constanta de inhibiție), K_I, care reprezintă constanta de echilibru pentru legarea moleculei de inhibitor la enzimă:

$$E + In \rightleftharpoons E\text{-}In$$

$$K_I = [E\text{-}In]/([E] \cdot [In]) \cdot \quad (24)$$

Parametrul K_I este una dintre cele mai importante mărimi pentru a caracteriza tăria unui IAC; cu cât K_I are o valoare mai mică, inhibitorul respectiv este mai eficace. Constanta aparentă de afinitate, K_{ap}, permite corectarea constantei inhibitorului pentru variațiile cu pH-ul ale reacției dintre enzimă și inhibitor – proces controlat de cel puțin două echilibre de transfer de protoni sus-menționate (reacțiile 18 și 20).

Pentru inhibitorii la care constantele de aciditate (K_{aIn}) se află în domeniul de variație al pH = 5,5-10,5, K_{ap} se exprimă conform ecuației 25 [86d]:

$$K_{ap} = (K_I/(1+(K_{aEnz}/H^+)) \cdot (1/(1+(H^+/K_{a\text{-}In})) \quad (25)$$

Studiile de determinare ale valorilor K_{ap} pentru o serie de inhibitori anionici (anorganici și organici) asupra izozimei AC I (umană), AC II (bovină sau umană), respectiv AC II substituită cu cobalt (Co(II)AC II, bovină) [86d] au evidențiat existența unor valori diferite ale acestora, care sunt redate în tabelul 4.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4

Constante de afinitate aparente (K_{ap}) ale inhibitorilor anionici pentru izozimele I, II şi CoAC II.

	$pK_{ap} = - \log K_{ap}$			
Anion	AC (B)bovină/	II[a] umană(H)	AC I[a] umană	CoAC II[b] bovină
HO^-	B	6,5[107]	–	–
HS^-	B	4,95[107]	–	5,80[108]
F^-	B	-0,08[107]	0,40[109]	1,60[110]
Cl^-	B	0,72[107]	1,30[109]	1,70[110]
Br^-	B	1,18[107]	1,64[109]	2,10[110]
I^-	B	2,06[107]	2,70[109]	3,04[110]
CN^-	B	5,58[107]	–	5[86b]
CNO^-	B	3,96[107]	–	5,15[86b]
SCN^-	B	4,04[107]	3,15[109]	3,80[86b]
N_3^-	B	3,23[107]	–	3,60[86b]
HCO_3^-	B	1,58[107]	–	1,00[86b]
HSO_3^-	B	1,52[107]	–	5[86b]
NO_3^-	B	1,32[107]	1,82[109]	3,52[110]
ClO_4^-	B	1,80[107]	2,89[109]	3,00[112a]
$HCOO^-$	H	1,74[111]	–	2,68[111]
CH_3COO^-	H	1,97[109]	1,58[109]	2,10[111]
FCH_2COO^-	H	0,89[111]	–	1,921[111]
CHF_2COO^-	H	1,30[111]	–	2,15[111]
CF_3COO^-	H	1,96[111]	–	1,96[111]
$C_2O_4^{2-}$	H	1,74[111]	–	2,68[111]

[a] Obţinute spectrofotometric la pH=7,5, din date de inhibiţie a reacţiei de hidroliză a 4-nitrofenilacetatului, la pH = 7,5.

[b] Obţinute spectrofotometric, la pH = 7,5.

Compararea datelor tabelului de mai sus, permite a afirma că afinitatea cea mai mare pentru ionul de Zn(II) din situsul activ al enzimei o are ionul HO^-. Excepţia o constituie sulfonamidele aromatice sau heterociclice, care au valori pK_{ap} comparabile sau mai mari decât HO^-; (vezi secţiunea 4.2.). De asemenea, se comportă ca inhibitori deosebit de puternici şi următorii ioni: CN^-, HS^-, SCN^-, CNO^- şi N_3^-. Caracteristica comună a acestora este capacitatea lor de a complexa diverşi cationi tranziţionali. Particular în acest tip de reacţii este însă faptul că anionii care au în general afinitate mică pentru ionii metalelor tranziţionale (precum ClO_4^-; NO_3^-), sunt inhibitori relativ eficace, în special pentru izozima AC I. Pentru halogenuri, afinitatea inhibitorului pentru izozimele AC I şi AC II creşte odată cu creşterea greutăţii halogenului. De asemenea, trebuie menţionat faptul că izozima I şi Co(II)–AC II au afinitate mai mare pentru anioni, comparativ cu izozima rapidă AC II. În acelaşi context, trebuie menţionat că şi afinitatea pentru sulfonamide a diferitelor izozime ale AC variază foarte mult.

Studiind dependenţa de pH a legării diverşilor inhibitori de enzima nativă şi substituită cu Co(II) (pentru izozimele de origine umană şi bovină), Bertini şi Luchinat [86c] propun următoarele clase de inhibitori:

Scanned with OKEN Scanner

(i) *Inhibitorii de clasă A*

Aceste tipuri de inhibitori sunt reprezentate de baze conjugate ale acizilor tari (halogenuri, NO_3^-, ClO_4^-, CNO^- etc.). Legarea inhibitorului se realizează cu forma acidă a enzimei, de tipul $M–OH_2$, unde M = Zn(II), Co(II) etc. Dependența pK_{ap} de pH pentru legarea acestor inhibitori este redată în fig. 5A. Dependența este de tip sigmoidal, afinitatea inhibitorului pentru enzimă scăzând cu creşterea pH-ului.

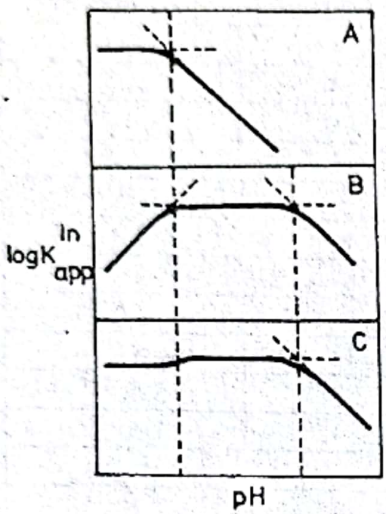
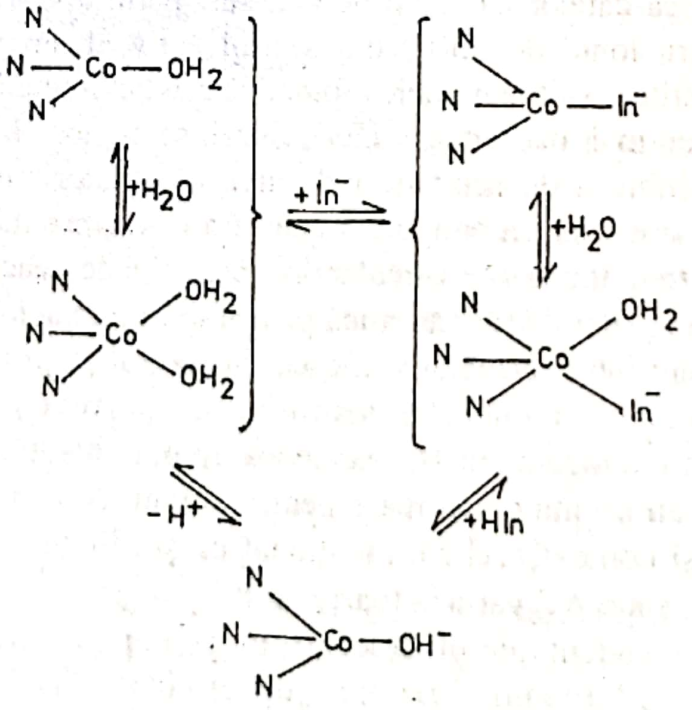


Fig. 5. Legarea inhibitorilor de clasa A, B şi C de enzima [86a] (vezi textul pentru detalii).

(ii) *Inhibitorii de clasă B*

Inhibitorii de clasă B sunt: CN^-, HS^- şi sulfonamidele (care se leagă de fapt ca anionii de tipul $ArSO_2NH^-$, (vezi secțiunea 4.2.). Aceştia prezintă o variație a pK_{ap} cu pH-ul în formă de clopot (Fig. 5B).

O astfel de dependență se poate explica doar considerând că forma acidă a enzimei leagă inhibitorul în forma anionică, sau alternativ, că forma bazică a enzimei leagă inhibitorul în stare neutră (Schema 2).



Schema 2

(iii) *Inhibitori de clasă C*

Reprezentanţii principali ai inhibitorilor de tip C sunt: imidazolul, 1,2,4-triazolul şi 1,2,3-triazolul [112b]. Caracteristic acestor compuşi este faptul că prezintă o variaţie cu pH-ul a valorii K_{ap} (Fig. 5C).

Principalele argumente care demonstrează legarea inhibitorilor anionici (şi/sau sulfonamidici) de ionul metalic prezent în situsul activ al enzimei sunt:

1) Apoenzima are o afinitate foarte mică pentru inhibitori anionici sau sulfonamidici (de până la 4 ordine de mărime mai mică, comparativ cu zinc-enzima) [105].

2) Constatarea unei puternice deplasări spre numere de undă mai mici a vibraţiei de întindere asimetrice N=N în spectrul IR al aductului AC II bovină cu N_3^- comparativ cu ionul de azidă necoordinat, datorită legării acestuia de Zn^{2+} în situsul activ al enzimei [113].

3) Interacţia directă între ionul Zn(II) din situsul activ şi anionul respectiv (CN^-, Cl^-, Br^-) relevată de studiile RMN (^{13}C–RMN, pentru aducţii AC I şi AC II $^{13}CN^-$ [114]; ^{35}Cl–RMN şi ^{81}Br–RMN, şi de cele de relaxare nucleară a unora dintre aceste nuclee) [115–117].

4) Determinarea prin studiile EXAFS a distanţei Zn – iod în aductul AC I cu iodura, care este de 2,65 Å [118].

5) Rezultatele studiilor spectrale (UV–VIS; RPE; ^1H–; ^{13}C–; ^{15}N–; ^{17}O– şi ^{113}Cd-RMN; DC etc.) pe enzime substituite cu diverşi ioni metalici (Co(II), Ni(II), Cu(II), Mn(II), Cd(II), V(IV) etc.) referitoare la mecanismele de legare a inhibitorilor de enzimă [85,86,105].

Prin înlocuirea ionului de Zn(II) din situsul activ al AC cu alţi ioni metalici, se obţin enzime substituite, care, în general sunt lipsite de activitate catalitică (o excepţie notabilă în acest sens fiind Co(II)-AC II). În tabelul 5 sunt redate activităţile relative ale unora dintre aceste enzime substituite de origine umană, pentru două reacţii catalizate de AC, precum şi geometria ionului metalic de la situsul activ.

Tabelul 5

Activităţi relative ale AC substituite cu diverşi ioni metalici şi geometria ionului din situsul activ

Enzima	Activitate relativă		Geometrie ion metalic	Ref.
	Hidratarea CO_2	Hidroliza *p*-O_2N-C_6N_4-OAC		
Zn(II)AC I	100	100	tetraedrică	65-68
Zn(II)ACII	294	270	tetraedrică	65-68
Co(II)AC I	56	322	tetraedrică, pH>7[a] bipiramidă trigonală, pH<7[a]	86,119
Cu(II)AC I	1	18	incertă[b]	120
Ni(II)AC I	5	12	octaedrică[c]	121
Mn(II)ACI	4	14	incertă[d]	122
Cd(II)AC I	4	7	tetraedrică	123
Hg(II)AC I	0	3	octaedrică[e]	121
VO(II)AC I	0	-	octaedrică[f]	124
Co(III)ACI	0	-	octaedrică distorsionată[e]	125

[a] Din ref. [105a]; [b] Pentacoordinată sau tetracoordinată (cu geometrie tetraedrică aplatizată) [120]; [c] Realizată cu nucleele imidazolice ale His-94, His-96 şi His-119, două molecule de apă şi gruparea OH a

Scanned with OKEN Scanner

Thr-199 (ref. 121); [d] Enzima este instabilă, fiind în echilibru cu 20% Mn(II) necomplexat; din date RPE nu se poate elucida geometria [122]; [e] Participă la coordinare OH din Thr-199 şi doi atomi de clor; [f] Cele trei resturi de His, două molecule de apă şi oxigenul ionului de vanadil.

Spectroscopia electronică a furnizat unele dintre dovezile cele mai importante referitoare la mecanismul de inhibiţie al AC. Enzimele cele mai utilizate în acest sens au fost Co-AC; Ni-AC şi Cu-AC.

În fig. 6 se redă spectrul Co-AC II bovine, în domeniul 8000-23000 cm^{-1} [86, 125], înregistrat la două valori ale pH-ului.

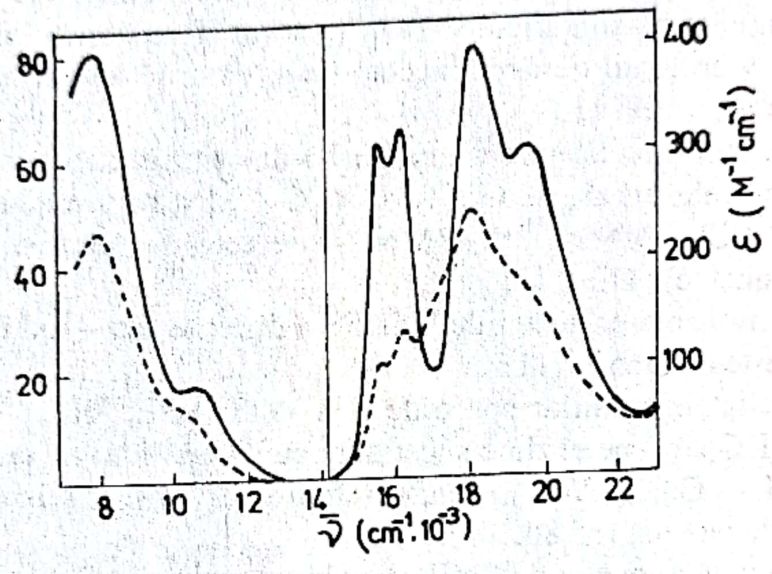


Fig. 6. Spectrul electronic al Co-AC II bovine, în soluţie netamponată, pH 5,8 (_ _ _ _) şi respectiv în prezenţa de tampon, pH 8,8 (_____) (adaptată din referinţa [86d]).

Una dintre caracteristicile cele mai importante ale acestui sistem este variaţia puternică cu pH-ul a spectrului electronic. Acest fenomen indică existenţa a variate echilibre acido-bazice care controlează activitatea enzimei (secţiunea 3). Totodată, alura acestui spectru indică existenţa unui cromofor de simetrie joasă [86]. Studii de susceptibilitate magnetică au demonstrat că ionul Co(II) este în starea de spin înalt în această proteină [126]. Ca urmare, singurele stereochimii posibile pentru Co(II) sunt cea pseudotetraedrică sau cea bipiramidal-trigonală, deoarece complecşii plani ar trebui să fie de spin jos, iar cei octaedrici să prezinte coeficienţi molari de absorbanţă mici, ceea ce nu se constată pentru această proteină (Fig. 6) [86a].

Studiind spectrele aducţilor AC substituite cu Co(II) cu un număr relativ mare de inhibitori anionici, Scozzafava, Bertini şi colab. [86, 124, 125] au demonstrat că acestea reprezintă teste sigure pentru determinarea geometriei ionului metalic de la situsul activ. Prin extrapolare, datele obţinute pe CoAC se pot apoi extinde la enzima nativă [86c].

Principalele benzi de absorbţie şi absortivităţile molare pentru aducţii CoAC II bovine cu diverşi inhibitori anionici sunt redate în tabelul 6.

După cum au demonstrat studiile clasice ale colectivului lui Scozzafava şi Bertini, [86,124,125], se disting trei tipuri principale de spectre:

Scanned with OKEN Scanner

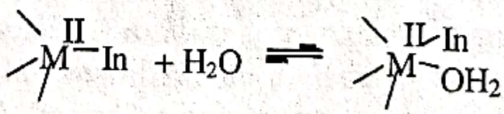
Tabelul 6

Date spectrale pentru aducții CoAC II bovine cu inhibitori anionici [86].

Inhibitor	pH[a]	Poziția benzii, ν ($cm^{-1} * 10^{-3}$); (absorbtivitate molară, $M^{-1}cm^{-1}$)
Enzima pură	5,9	8,2 (47); 10,5 (13)sh; 15,6 (100); 16,2 (135); 18,1 (250); 19,2 (180)
Enzima pură	8,0	8,2 (80); 11,0 (18); 15,6 (260); 16,2 (280); 18,1 (380); 19,2 (280)
F^-	7,5	7,8 (15); 8,4 (15); 9,0 (22); 9,7 (19)sh; 10,7 (16); 16,9 (170)sh; 18,2 (270); 19,2 (210)sh
Cl^-	7,5	8,0 (14); 10,6 (14); 13,9 (4)sh; 16,9 (270); 18,1 (220); 20,2 (160)
Br^-	7,5	8,5 (3); 10,5 (7); 14,0 (10)sh; 16,8 (200); 18,2 (200); 18,7 (90)sh; 20,3 (170)
I^-	7,5	10,5 (1); 13,2 (9); 15,9 (80)sh; 16,7 (120)sh; 18,1 (170); 18,9 (180); 20,1 (190)
CN^-	7,5	7,8 (100)sh; 8,7 (120); 10,2 (110)sh; 17,2 (700); 18,4 (500)sh
CNO^-	7,5	8,0 (60); 10,7 (75); 17,4 (600); 19,1 (450); 20,4 (180)sh
N_3^-	7,5	8,6 (24); 10,3 (31); 10,6 (30); 15,6 (65)sh; 17,6 (250); 18,4 (210); 21,2 (110)
SCN^-	8,1	10.2 (4); 10,6 (4)sh; 14,5 (9); 17,5 (100); 18,9 (90)sh; 21,5 (100)
HS^-	8,2	7,8 (25); 10,2 (30)sh; 10,9 (32); 16,3 (600); 18,4 (400)
HCO_3^-	8,2	7,8 (19); 8,5 (21); 8,8 (17); 11,0 (9); 15,6 (85); 16.3 (105); 18,2 (220); 19,4 (170)sh
HSO_3^-	6,5	10,2 (4); 13,6 (8)sh; 18,2 (110); 20,0 (90)sh
NO_3^-	7,5	8,6 (16); 10,2 (9); 14,2 (8); 18,0 (130); 21,1 (100)
AcO^-	7,5	8,3 (7); 10,2 (6); 14,1 (9); 18,0 (110); 19,4 (80)sh; 21,2 (100)
$PhCOO^-$	7,5	8,5 (15); 10,6 (6); 13,2 (4); 16,9 (160)sh; 18,0 (220); 19,7 (170)sh; 20,8 (110)sh
$C_2O_4^{2-}$	7,5	14,5 (14); 17,7 (165); 19,3 (110)sh; 21,6 (100)

[a] Valoarea pH-ului la care s-a înregistrat spectrul, în apa ca solvent.

(a) Spectre intense, cu absorbtivități molare $\varepsilon_{max}>300\ M^{-1}\ cm^{-1}$, caracteristice pentru Co(II) tetracoordinat (ca de exemplu spectrul Co-AC II la pH > 7,5; spectrul aducților cu CN^-, CNO^-, SH^-, sulfonamide). Legarea inhibitorului de ionul metalic este descrisă în acest caz de specii de tipul I, redate în ecuația (26) (Schema 3).



M = Co, Cu (26)

I II

Schema 3

(b) spectre de intensitate mică ($\varepsilon_{max}<200\ M^{-1}cm^{-1}$), cu absorbții caracteristice între 12000-14000 cm^{-1} (ca de exemplu CoAC I umană la pH acid; aducții cu AcO^-; NO_3^-, I^-, SCN^-, oxalat, $[Au(CN)_2]^-$, $[Ag(CN)_2]^-$ etc.), care reprezintă un diagnostic de pentacoordinare a ionului de Co(II). Aceleași caracteristici spectrale ca și pentru aducții menționați anterior [127] au fost demonstrate și pentru diverșii compuși care modelează situsul activ al Co-AC. Legarea inhibitorului în acest caz este descrisă prin formule de tipul II (Schema 3).

c) spectre cu absorbtivități molare cuprinse între 200 și 300 $M^{-1}cm^{-1}$, (în regiunea vizibilă), și care în unele cazuri prezintă benzi și în regiunea 12000–14000 cm^{-1} (ca de exemplu Co-AC II bovină la pH acid, aducții cu halogenuri, azidă, bicarbonat,

Scanned with OKEN Scanner

benzoat etc.). Acestea au fost atribuite inhibitorilor a căror legare este intermediară între tetra- şi pentacoordinare la ionul de Co(II). Practic, legarea acestui tip de inhibitor este descrisă de echilibrul 26 din Schema 3.

În fig. 7 sunt redate spectrele a trei inhibitori care se leagă diferit de Co(II) în situsul activ al AC: cianatul, într-un aduct tetracoordinat (de tipul a); azida, intermediar între tetra- şi pentacoordinare (tipul c); tiocianatul, într-o geometrie trigonal-bipiramidală a cobaltului (tipul b).

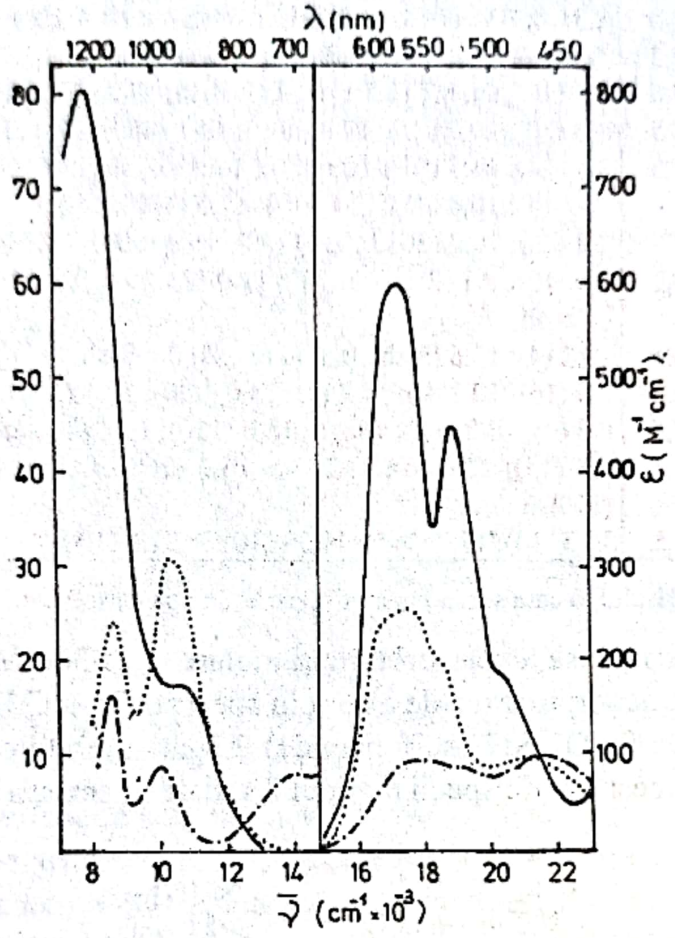


Fig. 7. Spectrul electronic al aducţilor Co-AC II bovine cu: cianat (____); azidă (.....) şi tiocianat (-.-.-.-.) (adaptată din ref. [86d]).

Ni-AC are de asemenea un spectru electronic dependent de pH şi de inhibitorii prezenţi în mediu. Enzima pură bovină prezintă absorbţii la 15600 cm^{-1} (ε= 20 $M^{-1}cm^{-1}$) şi 25600 cm^{-1} (ε = 50 $M^{-1}cm^{-1}$, elemente caracteristice pentru un cromofor de simetrie joasă [86d]. Modalitatea de legare a ionului de N_3^- de Ni(II) a fost studiată atât prin spectroscopie electronică, cât şi ^{1}H-RMN [128].

Spectrul electronic al Cu-AC II bovine prezintă o singură bandă largă de absorbţie, la 13000 cm^{-1}, puţin dependentă de pH [86d]. Cu toate acestea, constantele de afinitate ale inhibitorilor pentru Cu-AC sunt dependente de pH, pK_a-ul enzimei (ionizarea apei legate cu Cu(II)) fiind de 8,5 [86d]. O unică bandă de absorbţie largă, între 12000-14000 cm^{-1} s-a observat şi pentru aducţii cu diverşi inhibitori (azidă, iodură etc.) ai Cu-AC [86]. Legarea inhibitorilor se realizează probabil similar cu legarea de Co(II) din Co-AC, prin echilibre de tipul celor descrise de ecuaţia (26), în care predominantă pare a fi forma II (pentru M = Cu) [86].

Scanned with OKEN Scanner

Spectroscopia de rezonanţă paramagnetică electronică (RPE) a fost de asemenea mult utilizată pentru a studia interacţia inhibitorilor cu diverse AC substituite cu ioni paramagnetici. Pentru Co-AC lucrurile par a fi relativ complicate, deoarece spectrele RPE ale compuşilor conţinând Co(II) în spin înalt nu au actualmente cadrul teoretic necesar spre a fi interpretate [86d] şi în plus, valorile parametrilor g pentru speciile tetra- şi respectiv pentacoordinate se suprapun în general [129]. Pentru enzimele substituite cu Cu(II), V(IV) şi Mn(II), parametrii RPE permit obţinerea de informaţii importante privind legarea inhibitorilor de ionul metalic din situsul activ.

În tabelul 7 sunt redate valorile parametrilor g_{II}, $g_{\perp}$ şi A_{II} pentru aducţii Cu-AC I (umane) cu diferiţi inhibitori.

Tabelul 7

Parametrii RPE pentru CuAC umană şi aducţi ai săi cu inhibitori anionici [130] măsuraţi la temperatura azotului lichid.

Aduct	g_{II}	$g_{\perp}$	A_{II}
Enzimă pură	2.29	2.06	150
CN^-	2.24	2.09-2.02	122
CNO^-	2.31	2.11	119
N_3^-	2.27	2.09	112
HS^-	2.25	2.07	117
AcO^-	2.32	2.09	140

Concluzia care se poate trage din datele prezentate mai sus este că cei trei atomi de azot imidazolici din resturile de His din situsul activ al enzimei, care coordinează ionul de Cu(II), împreună cu oxigenul unei molecule de apă (de asemenea coordinată), formează un tetraedru aplatizat, a cărui geometrie rămâne invariabilă în aducţii cu diverşi inhibitori. Aceştia se leagă în poziţii axiale, ca al cincilea ligand al ionului de Cu(II). Valoarea cea mai sensibilă la variaţii angulare pentru complecşii pentacoordinati distorsionaţi ai Cu(II) este A_{II} [86d, 130]. Aceasta variază, între 150 şi 110 G, prezentând componente rombice importante (tabelul 7).

Spectrele RPE ale vanadil-AC au dovedit existenţa a două forme de enzimă, una acidă şi cealaltă bazică, similare cu enzima nativă sau cu alte enzime substituite cu diferiţi ioni metalici. S-a estimat că apa legată de ionul de V(IV) are pK_a în jur de 7,7 [124]. Spectrele RPE ale aducţilor enzimei conţinând V(IV), cu diverşi inhibitori anionici indică o creştere a numărului de coordinare a V(IV), care în astfel de complecşi devine hexacoordinat [124, 131].

Mn-AC conţine Mn(II) în spin înalt şi reprezintă una dintre puţinele mangan-proteine care posedă un spectru RPE bine rezolvat [122]. O sarcină dificilă, incomplet rezolvată este corelarea parametrilor RPE cu stereochimia ionului de mangan. Se consideră totuşi că în aducţii cu N_3^- şi oxalat, Mn(II) este pentacoordinat: în ultimul caz, substituindu-se molecula de apă coordinată la ionul metalic din situsul activ [132].

Spectroscopia de rezonanţă magnetică nucleară (RMN), reprezintă o altă tehnică care poate permite studiul mecanismelor de inhibiţie ale AC. Majoritatea acestor studii s-au realizat pe Co(II)AC [86b,e; 112, 133, 134, 134a], Ni(II)-AC [135] şi Cd(II)-AC [136,137]. Tehnicile utilizate includ experimente mono- şi

Scanned with OKEN Scanner

bidimensionale, ^{1}H- şi ^{13}C-RMN, în sisteme paramagnetice [86b,e;112,133-135], ^{13}C- şi ^{15}N-RMN pe enzima nativă [137], precum şi ^{113}Cd-RMN [136].

Spectrele ^{1}H-RMN ale proteinelor conţinând Co(II) în spin înalt (S = 3/2) prezintă semnale bine rezolvate [138]. Prin prezenţa ionului paramagnetic au loc deplasări izotropice importante ale semnalelor protonilor aflaţi în proximitatea acestuia, fără a se produce concomitent o lărgire considerabilă a lor, prin cuplaje cu electronii neîmperecheaţi [138, 139]. Deplasarea chimică a acestor semnale este consecinţa pe de o parte a unei contribuţii de contact (care depinde de dislocarea densităţii de spin pe care rezonează), iar pe de altă parte a unei contribuţii dipolare (care depinde de coordonatele sale în cadrul tensorului anizotropiei susceptibilităţii magnetice) [138, 139]. Din acest motiv, ionul de Co(II) poate proba schimbări structurale subtile şi justifica înscrierea utilizării spectroscopiei ^{1}H-RMN pe biomolecule mari şi complicate, între tehnicile de elecţie pentru cercetare [140].

Bertini, Scozzafava şi colab. [86, 132–134, 138, 140] studiind *in extenso* spectroscopia ^{1}H-RMN a trei Co-AC (izozimele: I (umană), II (umană) şi II (bovină)), cât şi aducţii acestora cu o multitudine de inhibitori anionici şi sulfonamidici, au furnizat date importante referitoare la mecanismele de legare ale inhibitorilor în situsul activ al enzimei. Rezultatele obţinute prin ^{1}H-RMN au fost corelate cu datele de spectroscopie electronică şi RPE, cât şi cu cele de cristalografie a razelor X [66, 68, 141, 142].

Spectrele ^{1}H-RMN (înregistrat la 200 MHz, în H_2O şi D_2O ca solvent) ale acestor trei izozime, sunt redate în Fig. 8 în timp ce în tabelul 8 sunt evidenţiate deplasările chimice ale principalelor semnale interpretate şi vitezele de relaxare longitudinală (T_1^{-1}) ale protonilor imidazolici din histidinele coordinate de ionul metalic [86e, 134].

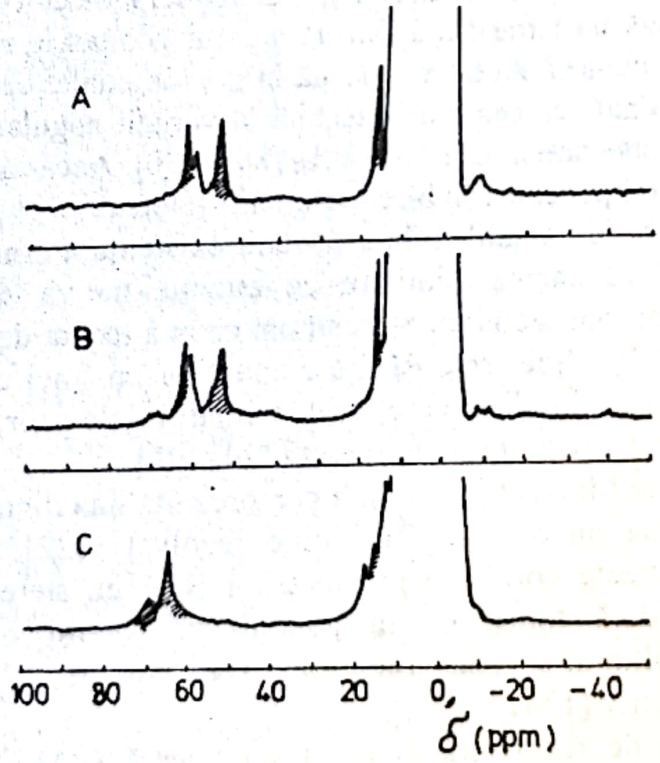


Fig. 8. Spectre ^{1}H-RMN la 200 MHz ale următoarelor izozime ale Co-AC: (A) II bovină; (B) II umană; (C) I umană, înregistrate în apă. Semnalele haşurate dispar când spectrele sunt înregistrate în D_2O (din referinţa [86e]).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 8

Deplasări chimice (δ, ppm) şi valori T_1 (ms) pentru Co-AC I şi II (bovină şi umană), la 200 MHz [86e].

CoAC II Bovină a δ(ppm)	(T_1)	CoAC II umană a δ(ppm)	(T_1)	CoAC I umană a δ(ppm)	(T_1)
62,1[b]		61,8[b]	6,5	69,2[b]	10,0
60,3	7,3	60,5	4,9	64,7[c]	9,4
54,2[b]		53,0[b]	6,4	38	
40,1 br	8,1	40,5[b]			
–		–		17,5	48
15,5[b]	(55)	15,5[b]	42	15,8[b]	40
12,5		12,5		13,3	
– 2.8		-2,6		– 3,4	62
– 4,6		-3,4	14,3	– 4,5	36
– 20				– 20	

[a] Relativ la Me_4Si ca standard (extern); H_2O sau D_2O ca solvent; [b] Semnal care dispare în D_2O; [c] Descreşte în intensitate în D_2O; br = semnal larg.

În interpretarea aspectelor furnizate de datele din fig. 8 şi tabelul 8 trebuie luat în considerare faptul că ionul metalic din situsul activ al enzimei este coordinat prin atomul de azot N-δ al His 119 şi prin atomii de azot N-ε ai His 94 şi His 96, ceea ce este prezentat schematic în fig. 9.

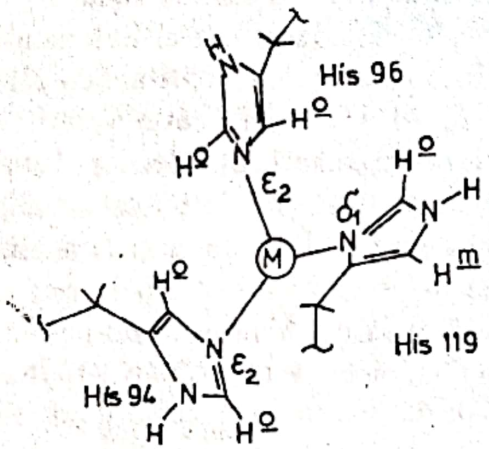


Fig. 9. Coordinarea ionilor metalici în anhidraze carbonice, cu evidenţierea protonilor imidazolici (de tip *orto* şi *meta*) care apar puternic dezecranaţi în spectrul ^{1}H-RMN al enzimelor substituite cu ioni paramagnetici.

A. *Pentru izozimele AC II de origine umană şi bovină*:

1. Pentru aceste două izozime aspectul spectrelor evidenţiază trei semnale deplasate paramagnetic spre câmpuri foarte joase, la aproximativ 62, 60 şi 54 ppm; ultimul semnal are intensitatea 2 (2H). La introducerea de D_2O în sistem se constată dispariţia semnalelor de la 62 şi 54 ppm. Aceste semnale sunt atribuite celor trei protoni imidazolici NH din resturile de histidină coordinate de ionul Co(II). Semnalul care nu schimbă în D_2O (de la 60,3 şi respectiv 60,5 ppm) este atribuit protonului Hδ2 (H^m) (Fig. 9) al His -119. Acesta este singurul proton de tip *meta*, faţă de atomul de azot prin care se face coordinarea, din cele trei resturi imidazolice din proximitatea ionului paramagnetic.

Scanned with OKEN Scanner

2. Semnalul larg de la aproximativ 40 ppm este atribuit unui proton de tip *orto* (H^o) al uneia dintre histidinele coordinate de Co(II); ceilalți protoni de tip *orto* nu dau semnale detectabile sau scapă detecției, probabil datorită lărgimii liniei semnalului.

3. Semnalul foarte larg de la -20 ppm este probabil datorat tot unui proton de tip orto de la un rest de His coordinată de Co(II).

B. *Pentru izozima AC I umană*:

1. Spectrul pentru izozima AC I umană prezintă un semnal la 69,2 ppm și un altul de intensitate 3 (3H) la 64,7 ppm. Primul semnal și 2/3 din cel de al doilea dispar la deuterare, ceea ce face ca atribuirea să fie similară cu cea de la izozima AC II (similar situației A.1.).

2. Apar de asemenea în spectru semnale ale protonilor histidinici de tip *orto*, la 38 și -20 ppm.

Atât pentru izozimele AC II, cât și AC I se distinge un semnal ascuțit la aproximativ -15,5 ppm, încă neatribuit, dar care aparține probabil unui rest de aminoacid necoordinat direct de Co(II), care însă simte deplasarea dipolară datorată interacției cu ionul paramagnetic [86c].

Valorile T_1 ale protonilor imidazolici din histidinele coordinate de Co(II) sunt puternic dominate de contribuții direcționate de ligand [143], această influență îngreunând analiza acestor valori în cadrul teoriei Solomon-Bloembergen-Morgan [144]. După cum au arătat însă rezultatele recente ale colectivului de cercetare din Florența [86, 140, 143, 146, 147], cu cât aceste valori sunt mai mari (pentru relaxarea protonilor din liganzii coordinați de ionul paramagnetic), cu atât contribuția unor specii pentacoordinate la Co(II) este mai importantă. Din acest motiv, acești parametri sunt deosebit de importanți la analiza spectrelor aducților Co-AC cu diverși inhibitori.

În tabelul 9 sunt redate deplasările chimice și valorile T_1 pentru aducții Co-AC II (bovine) cu următorii inhibitori anionici: AcO^-, NO_3^-, ClO_4^-, NCO^- și N_3^- [134].

Tabelul 9

Deplasări chimice δ (ppm) și valori T_1 (ms) pentru aducții CoAC II bovine cu inhibitori anionici, la 200 MHz, pH 6,2-6,4, în H_2O sau D_2O ca solvent.

Semnal	CoAc II	+AcO^-	+NO_3^-	+ClO_4^-	+NCS^-	+NCO^-	+N_3^-
NH (His)	62,1 (7,3)	66,0 (20,3)	66,2 (20,3)	69,0 (9,5)	68,7 (18)	62,1 (3,1)	57,8 (6,2)
H^m (His-119)	60,3		70,1 (12)	63,4 (5,7)	69,0	55,5 (3,6)	59,9 (7,8)
NH (His-119)	54,2	75,0 (19,5)	78,7 (12)	64,3 (5,4)	91,2 (14)	59,8 (2,5)	74,1 (5,5)
NH (His)	8,1 54,2	55,0 (22,5)	51,1 (27)	52,4 (14,6)	59,5 (25)	67,3 (2,2)	71,7 (5,4)
grupa CH_3 câmp jos	6	15,7 (24)	20,1 (19)	13,3 (10)	11,4	10	10
grupa CH_3 câmp înalt	−3	-11,8 (40)	-13,1 (28)	-7,7 (20)	-17,3 (44)	-5,6 (7)	-14,9 (17)
Geometria Co(II)	tetraedrică	bipiramidă	trigonală	(pentacoordinată)		tetraedrică	intermediară

Scanned with OKEN Scanner

Ca şi în cazul spectrelor electronice discutate anterior, datele RMN (tabelul 9) indică existenţa a două tipuri majore de interacţii situs activ-inhibitor, precum şi a uneia intermediare între cele două:

1. În spectrele aducţilor cu AcO^-, NO_3^-, ClO_4^-, $^-OOC\text{-}COO^-$, I^-, $[Au(CN)_2]^-$, spectrele ^{1}H-RMN prezintă semnale deplasate izotropic spre câmpuri foarte joase (între 70-90 ppm), datorate legării într-o geometrie trigonal-bipiramidală a Co(II) din situsul activ. Aceasta conduce la despicări de câmp zero mai mari în comparaţie cu Co(II) în geometrie tetraedrică [145], şi anizotropie magnetică mărită. În acest mod apar contribuţii mărite la componenţa dipolară a deplasării chimice, ceea ce are ca urmare răspândirea mai puternică a semnalelor protonilor histidinici, chiar în prezenţa unor contribuţii de contact similare [86e, 134]. Lărgimea acestor semnale este de asemenea mai mică în comparaţie cu semnalele corespunzătoare ale enzimei pure. Cu alte cuvinte, în aceste spectre ionul de Co(II) are o geometrie trigonal-bipiramidală, inhibitorul legându-se monodentat de Co(II), care în afara celor trei liganzi imidazolici mai coordinează şi o moleculă de apă. Pe de altă parte şi valorile T_1 ale protonilor imidazolici sunt mai mari decât valorile corespunzătoare din enzima pură şi din aducţi cu alţi inhibitori – tipic între 10-20 ms, comparativ cu 6-8 ms (vezi tabelele 8, respectiv 9).

2. În raport cu cele prezentate mai sus, spectrul aductului cu CNO^- este mult diferit: răspândirea semnalelor este mai mică (doar până la 67 ppm, comparativ cu 91 ppm în aductul cu SCN^-), iar valorile T_1 sunt de asemenea mai mici. Aceste rezultate, corelate cu datele de spectroscopie electronică, confirmă existenţa unei geometrii pseudotetraedrice a Co(II) în acest complex.

3. Spectrul aductului cu azidă are un aspect intermediar între spectrele de tipul (1) şi (2) prezentate mai sus, ceea ce conduce la concluzia că legarea de Co(II) conduce la echilibre între tetra-şi pentacoordinarea ionului metalic din situsul activ.

Studii similare au fost efectuate şi pentru a determina parametrii T_1 pentru legarea unor inhibitori, ca de exemplu N_3^- sau $C_2O_4^{2-}$ de NiAC II (bovină) [128] şi MnAC II [132]. Prin astfel de măsurători s-a determinat de exemplu că azida nu înlocuieşte apa legată de ionul metalic, ci se adiţionează la sfera de coordinare a acestuia [128].

Datele de ^{13}C-RMN pe aducţii Cu-AC II cu HCO_3^- şi AcO^- au dovedit existenţa unei legături Cu-O, iar măsurători ale vitezei de relaxare ^{1}H-RMN în soluţii apoase ale aducţilor Cu-AC II cu diverşi inhibitori (azidă, iodură, acetat, oxalat etc.) au arătat că aceştia nu îndepărtează apa legată de ionul metalic prin inhibarea enzimei [86d, 146].

Rezultate similare s-au obţinut şi pe enzima substituită cu Cu(II), prin studii de relaxare cu izotopul ^{17}O [147].

Spectroscopia ^{113}Cd-RMN este o altă tehnică prin care s-au furnizat importante date referitoare la mecanismul de inhibiţie al AC. Cd(II)-AC are o activitate catalitică esterazică slabă, activitate care însă creşte prin mărirea pH-ului la valori peste 9 [123]. Geometria ionului de Cd(II) este similară cu cea a Zn(II) din enzima nativă, fiind tetraedrică. Izotopul ^{113}Cd are spinul 1/2, fiind un cation ideal pentru a studia o multitudine de zinc-enzime [136]. Domeniul de deplasări chimice

Scanned with OKEN Scanner

pentru ^{113}Cd este situat în jurul valorii de 600 ppm, ceea ce permite ca spectroscopia ^{113}Cd-RMN să ofere probe sensibile referitor la alterarea naturii şi geometriei liganzilor din situsul activ al enzimei care îi conţine [136]. De asemenea, cu sprijinul acestui nucleu este posibil studiul fenomenelor dependente de timp (ca de exemplu schimbul de liganzi), cuprinse între 10^{-1}-10^{-5}s, pe scala de timp RMN.

Deplasările chimice ^{113}Cd-RMN pentru izozimele AC I (umană) şi AC II (umană şi bovină) substituite cu ^{113}Cd şi pentru aducţii lor cu diferiţi inhibitori anionici [136] sunt redate în tabelul 10.

Tabelul 10

Deplasări chimice ^{113}Cd (δ, ppm) ale izozimelor CdAc I şi II respectiv ale aducţilor acestora cu diverşi inhibitori anionici în D_2O [136]

Sistem	pH	δ* (ppm)
AC II (bovină)	8,0	214
AC II (umană)	8,1	225,7
AC II (umană) + 4eq. Cl^-	8,1	239,0
AC I (umană)	9,1	145,5
AC I (umană) + 4eq. F^-	8,9	–
AC I (umană) + 4eq. F^- +2e I^-	8,9	225,5
AC I (umană) + 4eq. Cl^-	8,9	241,0
AC I (umană) + 4eq. Cl^- +4e I^-	8,9	225,5
AC I (umană) + 4eq. Br^-	8,9	236,2
AC I (umană) + 4eq. I^-	8,9	225,5
$CdCl_2$ (în tampon standard)	6,0	55,8

*Relativ la 0,1 M $Cd(ClO_4)_2$ ca standard extern.
Ni(II) este hexacoordinat în Ni-AC II.

După cum se observă din datele tabelului, legarea inhibitorilor în situsul activ al Cd-AC are ca urmare deplasarea parametrilor δ cu 50-100 ppm. Evident este şi faptul că F^- are o afinitate mică pentru ionul metalic, în timp ce afinitatea halogenului creşte odată cu creşterea greutăţii atomice a acestuia. Acest fapt s-a constatat de altfel şi pentru enzima nativă [148]. Din acest motiv, în prezenţa de iodură şi/sau altă halogenură, se formează doar complexul enzimei cu I^-. În schimb, apare rezonanţa specifică doar pentru E-^{113}Cd-I, la 225,5 ppm. Se consideră că ionul de Cd(II) este tetracoordinat în aceşti complecşi, inhibitorul dislocuind molecula de apă legată de ionul metalic din situsul activ al enzimei. Ca şi în cazul Co-AC, se observă diferenţe mari între izozimele AC I şi AC II substituite cu ^{113}Cd. Aceste diferenţe au fost interpretate ca fiind datorate unor modificări minuscule în geometriile de coordinare. Explicaţia rezidă în prezenţa unor resturi diferite de aminoacizi adiacente ionului metalic (în cele două izozime) sau a unei reţele variate de legături de hidrogen în situsurile active ale izozimelor studiate. Se remarcă însă că aceste diferenţe se estompează pentru izozimele inhibate cu Cl^-, probabil din cauza geometriei care devine mai rigidă, fapt ce produce încetinirea proceselor de schimb cu liganzii externi [136].

Până în prezent, au fost raportate structurile determinate prin cristalografie de raze X pentru aducţii izozimei umane AC II cu următorii inhibitori anionici: SCN^-[149], HSO_3^- [142], N_3^- [151], Br^- [151] (pentru enzima nativă) şi a aductului AC I cu bicarbonat (pentru un mutant conţinând Thr-200 în locul His-200) [152].

Scanned with OKEN Scanner

În aductul cu tiocianat, ionul de Zn(II) este pentacoordinat; în afara celor trei resturi de His şi a moleculei de apă, inhibitorul se leagă prin atomul de azot, cu distanţa Zn-N de 1,9 Å. Distanţa Zn-O (dintre ionul de zinc şi molecula de apă) este de 2,2 Å, iar distanţa dintre aceşti doi liganzi ai zincului este de 2,4 Å.

Resturile de His din complex au acelaşi aranjament ca şi în enzima neinhibată, însă se produc schimbări importante prin dislocuirea moleculei de apă *adâncă* (H_2O-263; *deep water*) de către SCN^-. În felul acesta, atomul de sulf al inhibitorului se găseşte la o distanţă de 4,1 Å de azotul amidic al Thr 199. Pe de altă parte, se menţine legătura de hidrogen dintre gruparea OH a Thr 199 şi oxigenul grupării COO^- din Glu 106 (de 2,5 Å), ca şi în enzima nativă. Ionul SCN^- este în contacte van der Waals cu următoarele resturi de aminoacizi: Val-143, Leu-198, Trp-209 [149].

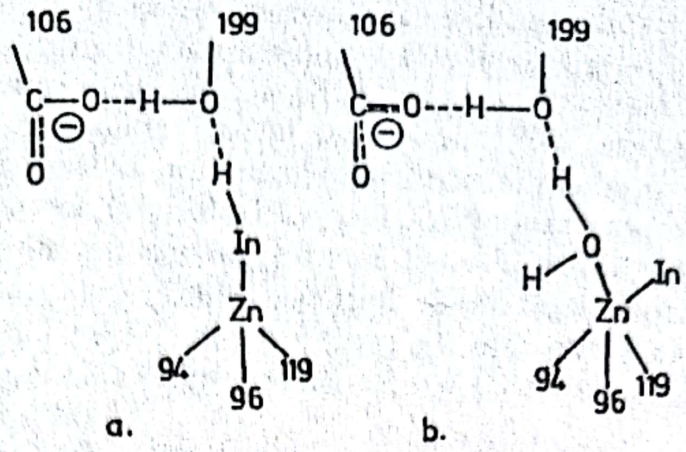
Legarea inhibitorului HSO_3^- se face complet diferit de cea a tiocianatului. În acest complex, ionul de Zn(II) îşi menţine geometria tetraedrică, apa legată de el fiind dislocuită de inhibitor. Distanţa Zn-O este de 2 Å; acelaşi atom de oxigen care este legat de Zn^{2+} formează o legătură de hidrogen cu gruparea OH din Thr 199. Un alt atom de oxigen din bisulfit formează o legătură de hidrogen cu gruparea NH amidică a acestui rest de aminoacid. Evident, molecula de apă adâncă (H_2O-263) nu mai este prezentă în situsul activ al complexului. Alte schimbări structurale nu se constată comparativ cu enzima neinhibată.

Recent, grupurile lui Liljas şi Lindskog [152] au raportat structura complexului unui mutant al AC I cu bicarbonatul (mutantul conţine Thr-200 în locul His-200 din enzima nativă). Acest mutant are o afinitate mai mare pentru bicarbonat, comparativ cu izozimele nemutante. Geometria de coordinare a ionului de Zn(II) din acest complex este intermediară între cea tetraedrică şi cea trigonal-bipiramidală, bicarbonatul fiind definit de aceşti autori ca fiind un ligand „pseudo-bidentat" [152]. Unul dintre atomii de oxigen din HCO_3^- este localizat în locul moleculei de apă legată de Zn(II) în enzima neinhibată, la o distanţă de 2,2 Å de Zn^{2+} şi de 2,6 Å de Oγ1 din Thr-199. Un alt atom de oxigen din bicarbonat este la 2,5 Å de ionul de zinc şi la 2,8 Å de o moleculă de apă (H_2O-389), care la rândul său este conectată cu atomul de azot Nε2 al His-200 prin intermediul unei alte molecule de apă (H_2O-359), într-o reţea extinsă de legături de hidrogen. Al treilea atom de oxigen al bicarbonatului este la 3 Å de gruparea NH amidică a Thr-199, în apropierea poziţiei apei adânci (care nu mai este prezentă în situsul activ al enzimei). În acest mutant, nucleul imidazolic al His-64 este rotit cu 180°, fiind situat spre regiunea în care se găseşte ionul de zinc, comparativ cu poziţia sa din enzima necomplexată [152]. Din aceste date, se poate deduce că modul de legare al substratului HCO_3^- este ideal pentru cataliză, deoarece în cursul conversiei sale la CO_2 nu mai este necesară o izomerizare nefavorabilă energetic, starea de tranziţie fiind astfel realizată cu rearanjări structurale minime.

Rezultatele investigaţiilor cristalografice confirmă datele spectrale menţionate anterior privind interacţia inhibitorului cu situsul activ al enzimei.

Ţinând cont de corelarea acestor tipuri de informaţii structurale, Lindahl şi colab. [141] au propus o modalitate generală de legare a inhibitorilor, de tipul celei prezentate mai jos (Schema 4).

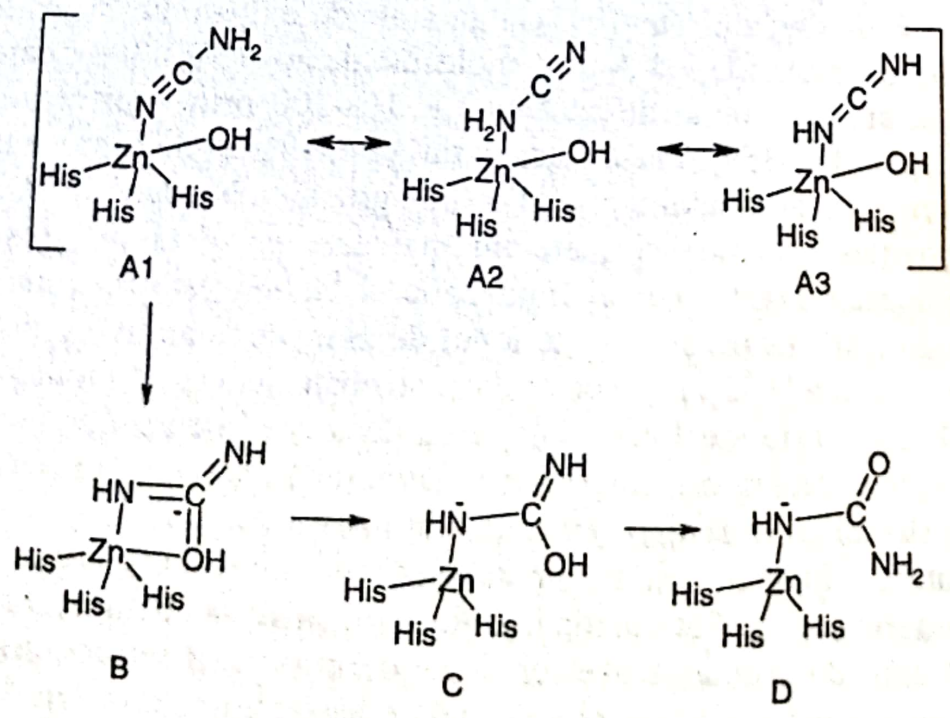
Scanned with OKEN Scanner



Schema 4

Conform modelului propus, doar inhibitorii care posedă o grupare protonabilă (HIn: H_2O, HSO_3^-, HCO_3^-, RSO_2NH^- etc.) se pot lega în geometrii tetraedrice ale ionului Zn(II). Aceşti inhibitori acţionează ca donori de legături de hidrogen pentru gruparea OH a Thr 199. În schimb, inhibitorii „neprotonaţi" (In) nu se pot lega decât în geometrii pentacoordinate ale ionului de zinc (exemplul tipic fiind SCN^-). Ipoteza de legare propusă de Lindahl şi colab. necesită aprofundarea studiilor respective deoarece de exemplu ionii CN^- şi CNO^- – care sunt inhibitori neprotonaţi – se pare că se pot lega în geometrie tetraedrică a Zn(II), după cum rezultă din anumite date spectrale [86], menţionate anterior.

Un inhibitor de tip particular al AC a fost recent descoperit de către unul dintre autorii acestei cărţi: ureea [84b]. Acest compus, izosteric şi izostructural cu acidul carbonic, se formează prin hidroliză (catalizată de enzimă) în situsul activ al AC, a cianamidei legate de ionul metalic, după cum se redă în schema 4A:



Schema 4A. Mecanismul de inhibiţie al AC cu ureea formată la hidratarea cianamidei legate la ionul metalic din situsul activ al enzimei.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de legare al cianamidei/ureei la AC a fost studiat prin spectroscopie electronic (utilizând Co(II)-AC) şi cristalografie de raze X (utilizând enzima nativă, la o rezoluţie de 1,7 Å). Cianamida coordinează direct la ionul metalic din enzimă, dar forma tautomeră în care acest inhibitor se leagă nu a fost determinată pentru moment [84b]. În Schema 4A sunt prezentate trei diverse posibile structuri ale aductului AC cu cianamida (A1-A3). Aductul AC II – cianamida nu este însă stabil: de fapt în experimentele de cristalografie de raze X prin care se urmărea evidenţierea modului de legare a acestui inhibitor la AC, după rezolvarea structurii s-a constatat prezenţa unei molecule de uree legate de zinc în locul cianamidei aşteptate. Evident, ureea s-a format prin hidratarea catalizată de AC a cianamidei legată în situsul activ, conform mecanismului prezentat în Schema 4A. Intermediarul B se formează în urma atacului nucleofil al ionului hidroxil legat de Zn(II) asupra cianamidei. Se formează un anion al pseudo-ureei C, care izomerizează apoi la aductul stabil D [84b]. O particularitate deosebit de interesantă a acestuia este stabilitatea sa foarte mare. Practic, în aductul AC–uree, inhibitorul este fixat la enzimă printr-o legătură coordinativă (distanţa Zn–N este de 2 Å), şi printr-o reţea de şase legături de hidrogen la care participă resturi de aminoacizi şi molecule de apă prezente în situsul activ (vezi Fig. 4A). Datorită acestor interacţiuni multiple, este imposibil a dislocui ureea din situsul activ al enzimei, chiar utilizând inhibitori sulfonamidici cu afinitate nanomolară pentru AC. Ureea este unicul inhibitor non-reversibil al AC [84b].

4.2. Inhibiţia cu sulfonamide

Descoperind inhibiţia AC cu sulfanilamida în 1940, Mann şi Keilin [10], au demonstrat apoi că toate sulfonamidele aromatice nesubstituite la gruparea SO_2NH_2 posedă astfel de proprietăţi, în ciuda faptului că aceşti compuşi nu sunt agenţi complexanţi buni în mediu apos [150]. Această caracteristică este doar a sulfonamidelor, deoarece în general alte tipuri de inhibitori ai AC posedă proprietăţi complexante marcante (CN^-, N_3^-, CNO^- etc. – secţiunea 4.1.).

Interacţia sulfonamidelor cu situsul activ al AC este deosebit de specifică şi permite, cu puţine excepţii, obţinerea de aducţi cu stoichiometrie enzimă-inhibitor de 1:1. Primele studii care au urmărit modul de interacţie al AC cu inhibitorii sulfonamidici au făcut apel la experimentele de dializă la echilibru privind absorbţia optică (pentru sulfonamide colorate) sau activitatea specifică (pentru sulfonamide radiactive, ca de exemplu ^{3}H-acetazolamida) în prezenţa apoenzimei sau/şi a metaloenzimei [105a, 108]. Prin astfel de studii s-a dovedit că apoenzima leagă de 10^4 ori mai slab sulfonamidele comparativ cu zinc-enzima [105a], iar în prezenţa altor ioni metalici afinitatea enzimei substituite pentru acetazolamidă scade în ordinea: Zn-AC > Co-AC >> Cu-AC > Mn-AC [105a].

Compararea modului de acţiune al inhibitorilor AC a evidenţiat existenţa de similitudini între legarea inhibitorilor anionici şi sulfonamidici de ionul metalic din situsul activ al enzimei. Practic, s-a demonstrat că sulfonamidele se leagă de ionul metalic în forma ionizată ca anioni RSO_2NH^-. În clasificarea lui Bertini şi Luchinat

Scanned with OKEN Scanner

[86c] (secţiunea 4.1.) sulfonamidele sunt inhibitori de clasa B, având un profil de legare funcţie de pH în forma de clopot [105,153].

Variaţiile constantelor K_I în funcţie de pH pentru câteva din aceste sulfonamide inhibitoare de AC sunt redate în fig. 10 [105b].

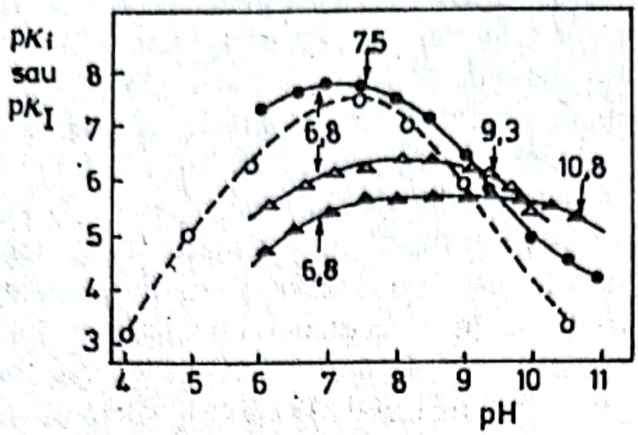


Fig. 10. Dependenţa de pH a legării inhibitorilor sulfonamidici de izozima AC II (bovină): (·) acetazolamida; (Δ) sulfanilamida; (Δ) clorotiazida; (o) acetazolamida şi izozima AC I (umană).

Forma de clopot a curbelor din figura prezentată mai sus este expresia modului de legare a inhibitorului de enzima care (după cum s-a arătat anterior) depinde atât de valoarea pK_{aEnz}, cât şi de valoarea pK_{aIn}.

În Tabelul 11 sunt prezentate valorile constantelor de inhibiţie K_I pentru câteva sulfonamide IAC [16], faţă de izozimele AC I – IV umane.

Tabelul 11

Valori K_I faţă de izozimele AC I – AC IV pentru câteva sulfonamide IAC [154–157].

Inhibitor*	K_I (nM)			
	AC I	AC II	AC III	AC IV
Sulfanilamida	5×10^4	10^3	5×10^6	$2{,}6 \times 10^4$
Acetazolamida	200	7	3×10^5	66
Metazolamida	10	7	10^5	33
Etoxzolamida	1	0,5	5×10^4	13
Dorzolamida	5×10^6	2	8×10^4	33
Clorzolamida	1	1	300	19
$CF_3SO_2NH_2$	16	2	900	45

*Pentru structurile chimice ale inhibitorilor vezi secţiunea 5.

Valorile pK_{ap} ale unor sulfonamide frecvent utilizate ca IAC (precum acetazolamida, metazolamida, etoxzolamida, sulfanilamida, *p*-toluensulfonamida [86d]), atât pentru enzima nativă, cât şi pentru enzime substituite cu diverşi ioni metalici sunt prezentate în tabelul 12.

Aceste date arată afinitatea foarte diferită a sulfonamidelor pentru variatele tipuri de izozime ale AC. Astfel, în general , ordinea de inhibiţie este: AC II > AC IV ≡ AC I >> AC III. Diferenţele între izozima cu afinitatea cea mai mare pentru sulfonamide (AC II) şi respectiv cu afinitatea cea mai mică pentru aceşti inhibitori (AC III) sunt importante, de ordinul a 10^2-10^5. Remarcabilă este comportarea ultimelor două sulfonamide din tabelul 11 (clorzolamida şi triflilamida – vezi secţiunea 5),

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 12

Constante de afinitate (pK_{ap}) aparente ale unor sulfonamide pentru anhidraze carbonice substituite [86d].

Inhibitor	AC I*[1]	AC II*[1]	Co(II)AC*[1]	Cu(II)AC*[1]	Ni(II)AC*[1]
Acetazolamida	7,1	7,1	6,82*[2]	5,15	5,6
Sulfanilamida	5,49	4,55	5,34*[2]	–	–
4-Toluensulfonamida	–	7,09	–	–	4,44

*[1] Enzimele sunt izolate din sursă umană.

*[2] Toate valorile se referă la măsurători efectuate la pH 7,5, mai puțin cele pentru Co(II)AC care s-au obținut la pH 8.

care – deşi cu structuri diferite – au totuşi o putere inhibitorie semnificativă asupra izozimei AC III, rezistentă în general la acțiunea sulfonamidelor. Dintre diversele sulfonamide, inhibiție mai puternică prezintă cele heterociclice comparativ cu cele carbociclice. Deşi până relativ recent se considera că sulfonamidele alifatice nu sunt IAC [16], Maren şi colab. [157] au detectat o foarte bună activitate pentru trifluorometilsulfonamidă. Compusul (ca dealtfel întreaga clasă de inhibitori de acest tip, perhaloalchilsulfonamidele) este însă puțin investigat actualmente [157].

Din datele tabelului 12 se observă pe de altă parte că sulfonamidele au afinitate mai mică pentru izozimele AC substituite cu alți ioni metalici decât Zn(II), proprietate menționată anterior doar calitativ [86d].

Datorită faptului că reacția de echilibru între sulfonamidă şi AC este lentă [16], prin metode de tip *stopped-flow* (flux oprit) au putut fi măsurate constantele cinetice de asociere (k_a), respectiv de disociere (k_d) ale inhibitorului din situsul activ [158].

$$E + In \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} E\text{-}In \qquad (27)$$

Constanta inhibitorului (K_I) se poate defini şi ca raportul celor două constante cinetice amintite mai sus:

$$K_I = k_d / k_a \qquad (28)$$

Pentru diferite sulfonamide IAC (tabelul 11), K_I diferă cu un coeficient de 10^5 (între compuşii foarte activi, cu valori K_I de ordinul *n*M şi respectiv compuşii puțin activi, cu valori K_I de ordinul 10^{-4} M) [16]. Determinările constantelor cinetice k_a şi k_d au relevat că pentru constanta de asociere există diferențe mari, existând sulfonamide care se asociază rapid cu enzima şi altele care se asociază mai greu (având constanta de asociere de până la 240 de ori mai mică); pentru k_d raportul respectiv este de maxim 80 [158]. În tabelul 13 se redau câteva valori ale celor două constante cinetice – k_a şi k_d – determinate prin metodele *stopped-flow* menționate anterior [158].

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 13

Constante cinetice de asociere (k_a) şi disociere (k_d) ale sulfonamidelor IAC în/din situsul activ al AC II umane, la 25°C şi pH 7,9

Inhibitor*	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_I (nM)
Sulfanilamida	7×10^4	0,15	2000
Acetazolamida	5×10^6	0,1	20
Benzolamida	6×10^6	0,05	9
Etoxzolamida	3×10^7	0,05	1,6
Dansilamida	$2,4 \times 10^5$	0,39	–
Benzensulfonamida	$1,6 \times 10^5$	0,16	1000
4-Hidroxi-3-nitrobenzensulfonamida	$5,5 \times 10^4$	–	–
4-Salicilazobenzensulfonamida	$1,13 \times 10^7$	–	–
4-n-Pentiloxicarbonilsulfanilamida	$4,7 \times 10^7$	0,02	0,4

*Pentru structuri chimice vezi secţiunea 5.

Aceste date sugerează că:

a) viteza de asociere a sulfonamidei cu enzima controlează în mare măsură procesul de inhibiţie [154a,158];

b) variaţia constantelor k_a şi k_d cu pH-ul este pentru k_a în formă de clopot, similară cu variaţia constantei termodinamice K_I, iar k_d este invariantă cu valoarea pH-ului – ceea ce constituie o probă în plus că asocierea este procesul cinetic care controlează inhibiţia AC cu sulfonamide (de menţionat că anionii monovalenţi discutaţi anterior în secţiunea 4.1. se echilibrează mult mai rapid cu enzima în comparaţie cu sulfonamidele [154]).

Din experimentele amintite mai sus nu reiese clar dacă sulfonamida se leagă în stare neutră de forma bazică a enzimei ($EZn^{2+} - {}^-OH$) (ecuaţia 29) sau dacă anionul sulfonamidat reacţionează cu forma acidă a enzimei ($EZn^{2+} - OH_2$) (ecuaţia 30):

$$EZn^{2+} - {}^-OH + RSO_2NH_2 \rightleftharpoons EZn^{2+} - {}^-NHO_2S{-}R + H_2O \qquad (29)$$

$$EZn^{2+} - OH_2 + RSO_2NH^- \rightleftharpoons EZn^{2+} - {}^-NHO_2S{-}R + H_2O \qquad (30)$$

Aceasta deoarece în ambele situaţii variaţia K_I cu pH-ul este în formă de clopot, în concordanţă cu dependenţa găsită experimental [105, 154]. În desfăşurarea reacţiei se crede că iniţial s-ar forma un complex, în care sulfonamida nu este direct coordinată la ionul metalic din situsul activ al enzimei şi care nu depinde de starea de ionizare a inhibitorului/enzimei, astfel că practic atât ecuaţia 29, cât şi ecuaţia 30 pot descrie legarea inhibitorului în situsul activ al enzimei [105].

King şi Burgen [159], analizând procesul de legare a sulfonamidelor din punct de vedere cantitativ, consideră că aceasta decurge în două etape distincte:

1. Inhibitorul se leagă iniţial de apoenzimă, formându-se un „complex iniţial" E-In_1 (ecuaţia 31):

$$E + In \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [E\text{-}In_1] \qquad (31)$$

instabil

Scanned with OKEN Scanner

2. Complexul inițial se izomerizează în complexul final (E-In_2), în care inhibitorul este coordinat la ionul metalic sub formă de anion sulfonamidat (ecuația 32):

$$[\text{E-In}_1] \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \text{E-In}_2 \qquad (32)$$

În studiul menționat au fost măsurate constantele cinetice pentru asociere/disociere de apoenzimă (k_1 și k_{-1}) și respectiv de zinc-enzimă, pentru câteva serii omoloage de sulfonamide aromatice [159]. Constanta de afinitate pentru apoenzima $K_{ap} = k_1/k_{-1}$ s-a constatat că atinge valori de aproximativ 10^3 M^{-1} pentru derivați simpli ai benzensulfonamidei și că este proporțională cu liposolubilitatea compusului respectiv. În etapa întâi a procesului nu este necesară existența unei grupe sulfonamidice nesubstituite în molecula inhibitorului, legarea fiind pusă în evidență și pentru sulfonamide N-acilate (de exemplu, N-acetilbenzensulfonamida), care sunt inhibitori deosebit de slabi ai zinc-enzimei: practic, ecuația 31 redă o interacție hidrofobă tipică [105, 154, 159].

Abia etapa a doua (de coordinare) – ecuația 32, implică ionul metalic din situsul activ al enzimei. Aceasta este dependența de pH și implică speciile ionizate ale enzimei și inhibitorului [159]. Satisfacerea acestor condiții poate explica inhibiția enzimei atât cu sulfonamide foarte hidrofile (deci hidrosolubile), cât și cu derivați cu liposolubilitate mare (hidrofobi). Cu primul tip de compuși este favorizată etapa a doua (ecuația 32), în timp ce cu compușii liposolubili prima etapă (ecuația 31), de pre-asociere dintre (apo)enzimă și inhibitor este cea favorizată. Practic, optimul de activitate – inhibitorii cei mai eficace – apare când molecula inhibitorului conține atât fragmente care induc liposolubilitate, cât și fragmente ce conferă hidrosolubilitate compusului respectiv, caracteristică abordată ca subiect principal în secțiunea 5 a lucrării.

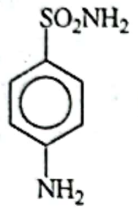
Procesul de asociere dintre enzimă și sulfonamidă se pare că este cel care controlează procesul de inhibiție și ar putea fi pus pe seama geometriei restrictive a cavității în care se leagă inhibitorul. Există însă unele obiecții în acest sens, deoarece s-a constatat că unele sulfonamide care posedă cicluri heteroaromatice voluminoase se leagă mult mai rapid comparativ cu derivații simpli ai benzensulfonamidei sau sulfanilamidei [105b] (tabelul 13). Din grafice Arrhenius ale constantei de asociere k_a pentru izozima umană AC II a 4-nitrobenzensulfonamidei s-a determinat că acest complex este stabilizat datorită variației mari de entalpie (ΔH^0 = –6,6 kcal/mol) [158] în procesul de complexare. Efectul se datorează atât interacției metal-ligand (în situsul activ al enzimei), cât și interacțiilor hidrofobe, forțelor van der Waals și legăturilor de hidrogen dintre diversele grupări ale inhibitorului și resturi de aminoacizi din situsul activ al enzimei.

Întrucât din studiile cinetice menționate nu reiese clar dacă sulfonamida se leagă de enzima în stare neutră sau ca anion sulfonamidat, s-a impus efectuarea unor experimente spectroscopice spre a elucida mecanismul posibil implicat.

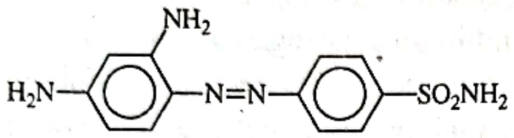
Scanned with OKEN Scanner

Multe sulfonamide IAC prezintă schimbări ale spectrului electronic în funcție de ionizarea grupării SO_2NH_2 [105b]. Un studiu aprofundat al caracteristicilor spectrale UV-VIS ale diferitelor sulfonamide aromatice în absența și în prezența AC, la diferite valori ale pH-ului, a demonstrat că în stare legată de enzimă spectrul electronic al sulfonamidei este tipic pentru forma RSO_2NH^- [105b,160].

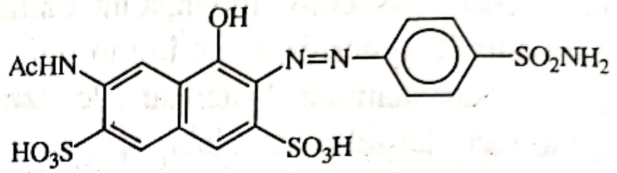
Concomitent, utilizarea sulfonamidelor colorate, posedând cromofori de tip azoic, a demonstrat că spectrul complexului enzimă-inhibitor prezintă deplasări batocrome și modificări hipocrome similare cu cele observate la ionizarea sulfonamidei și dizolvarea sa în solvenți nepolari. Din acest motiv, s-a concluzionat că situsul de legare al sulfonamidelor este relativ hidrofob [161]. Sulfonamidele utilizate în astfel de studii sunt derivați ai sulfanilamidei **1** de tipul **2**.



1

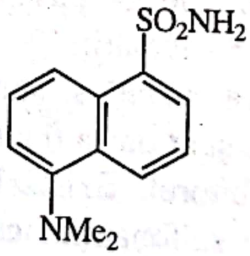


2a



2b

AC II bovina formează un complex intens fluorescent cu dansilamida **3** (5-dimetilamino-naftalen-1-sulfonamida) [162]. Dansilamida **3** liberă prezintă în spectrul de emisie de fluorescență un peak la 580 nm și un randament cuantic de 0,055. Complexul AC II bovină - dansilamidă are peak-ul la 468 nm și respectiv un randament cuantic de 0,84. Această puternică deplasare spre albastru poate fi explicată doar admițând că situsul de legare al inhibitorului este relativ hidrofob și că gruparea sulfonamidică este ionizată [162].



3

Pe de altă parte, eficiența transferului energiei fotonilor (de 85%), de la resturile triptofan din enzimă la molecula de dansilamidă, este cea mai mare observată până în prezent la o proteină [162].

Galley și Stryer [163] au investigat spectrele de fosforescență ale complexului 3-acetilbenzensulfonamidei cu AC II bovină. Resturile de triptofan din enzimă sunt excitate de radiații având lungimea de undă de 280 nm și promovează transfer de energie de tip triplet-triplet, comparativ cu sulfonamida care este excitată de radiații având lungimea de undă de 330 nm. Complexul AC II – 3-acetilbenzensulfonamidă excitat cu radiații de 330 nm generează însă un spectru de fosforescență specific resturilor de Trp și nu sulfonamidei, ceea ce

Scanned with OKEN Scanner

indică astfel că un rest de aminoacid din situsul activ al enzimei este situat în vecinătatea inhibitorului legat de ionul de Zn(II). Această topografie este confirmată de experimentele de cristalografie de raze X pe complecşii enzimei cu sulfonamide, care situează restul Trp-209 în apropierea situsului de legare al inhibitorului [66].

Spectrele electronice au oferit informaţii importante referitoare la modalitatea de legare a sulfonamidelor în situsul activ şi în cazul enzimelor substituite cu alţi ioni metalici, precum Co(II), Ni(II), Mn(II), Cu(II) etc. (secţiunea 4.1.). Scozzafava, Bertini şi colab. [86, 164], studiind prin spectroscopie UV-VIS aducţii Co-AC cu diverse sulfonamide aromatice şi heterociclice au evidenţiat că aductul Co-AC II cu acetazolamida prezintă următoarele benzi (ε, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$): 7900 (65); 9200 (65); 11000 (450; 16800 umar (500); 17400 (530); 18200 (220) şi 19300 (390) cm^{-1}. Acest spectru este tipic pentru Co(II) tetracoordinat şi este similar spectrelor aducţilor cu CN^- şi CNO^-. Legarea inhibitorului de ionul metalic se realizează prin atomul de azot sulfonamidic (sulfonamida fiind ionizată) şi dislocuirea moleculei de apă coordinate de Co(II) [86, 164].

Similar sulfonamidelor nesubstituite se leagă de ionul de Co(II) din situsul activ al Co-AC şi sulfonamidele N-substituite, precum N-hidroxi-tosilamida (TsNHOH) şi N-metoxi-tosilamida (TsNHOMe) (Ts = 4-CH_3-C_6H_4-SO_2–). Astfel de inhibitori au fost recent investigaţi prin spectroscopie UV-VIS [164d].

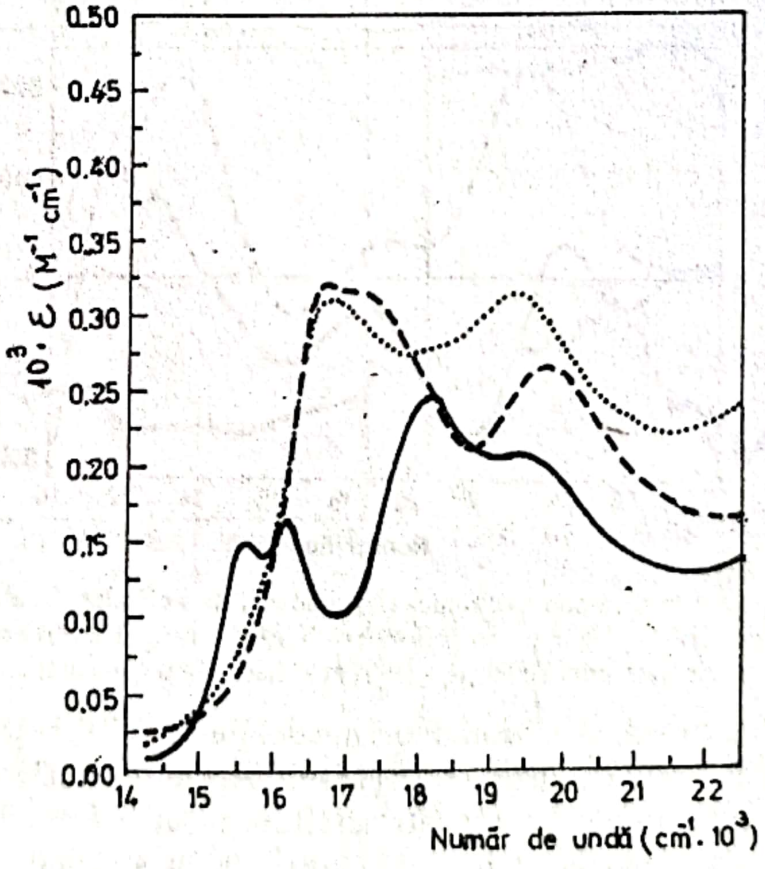


Fig. 11. Spectrul electronic al Co-AC II (bovine), 0,6 mM, pH 8 (tampon HEPES) (____); aductul acesteia cu TsNHOH (aceeaşi concentraţie de enzimă, pH 8; concentraţia de inhibitor 2,1mM) (_ _ _ _); aductul cu TsNHOMe (aceeaşi concentraţie de enzimă; pH 7,2 ; concentraţia de inhibitor 2 mM) (....).

Scanned with OKEN Scanner

În fig. 11 sunt prezentate spectrele electronice ale aducților Co-AC II cu cei doi inhibitori, comparativ cu spectrul enzimei necomplexate. Și în aceste cazuri legarea inhibitorilor se realizează prin atomul de azot sulfonamidic ionizat, ionul de Co(II) având o geometrie tetraedrică; spectrele din fig. 11 sunt foarte asemănătoare spectrelor aducților Co-AC II cu acetazolamida, cianat, cianură (menționate anterior) [164].

Prin spectroscopie electronică a fost de asemenea investigat aductul Ni-AC cu tosilamida (4-toluensulfonamida) [164c]. În fig. 12A sunt redate spectrele electronice ale enzimei și aductului acesteia cu sulfonamida, iar în fig. 12B spectrele de dicroism circular (DC) corespunzătoare.

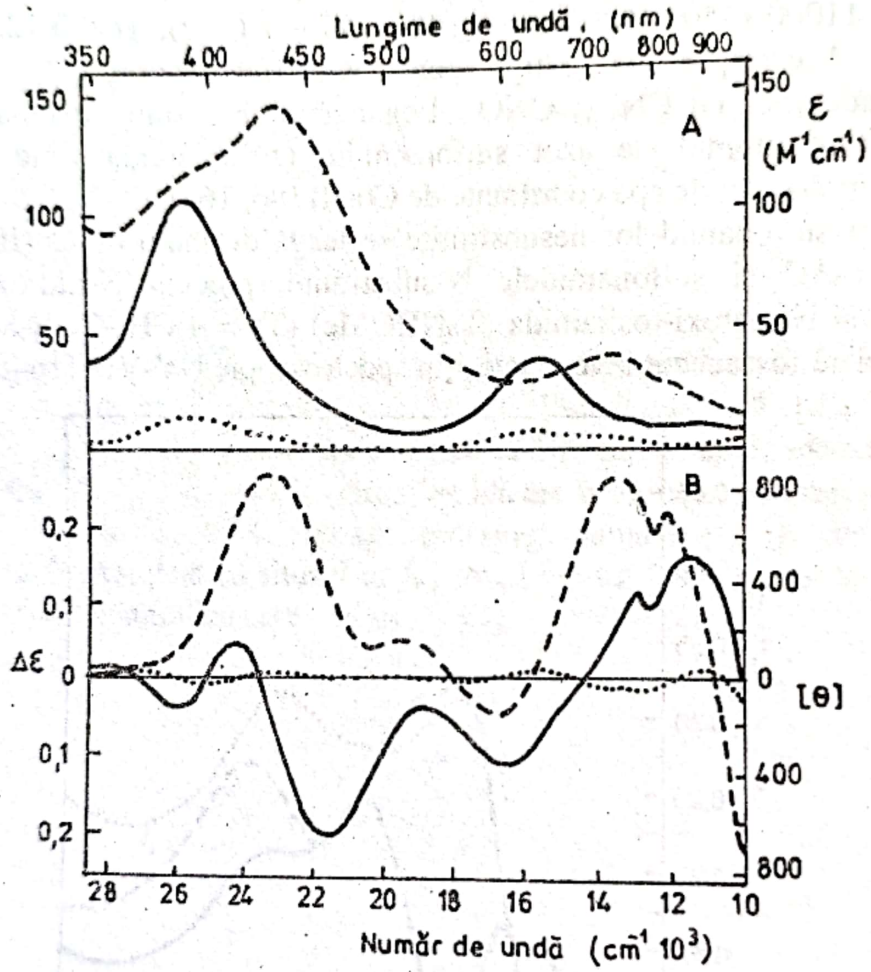


Fig. 12. Spectre de absorbție electronică (A) și de dicroism circular (B) ale Ni-AC II (bovine), la pH 10,3 , în absența (____) și în prezența (- - -) 4-toluensulfonamidei. Spectrele corespunzătoare ale tartratului de Ni (II) (....) sunt redate pentru comparație.

Spectrul electronic al aductului tosilamidei (la pH = 10,3) prezintă tranziții la 13700, 23200 și 26000 (umar) cm^{-1} [164c]. Acest spectru indică coordinarea inhibitorului prin gruparea NH_2 sau NH^- a sulfonamidei.

Spectrul DC (înregistrat în D_2O) între 10000 și 29000 cm^{-1} prezintă o elipticitate pronunțată pe tot domeniul investigat. Enzima necomplexată pură (la pH = 10,3) prezintă un peak pozitiv la 11400 cm^{-1}, o bandă negativă în regiunea corespunzătoare celei de-a doua tranziții electronice a Ni(II) și un peak negativ la 21700 cm^{-1}, ceea ce indică o simetrie joasă a cromoforului [86, 164]. Spectrul DC

Scanned with OKEN Scanner

al aductului cu tosilamida prezintă două absorbţii pozitive puternice la 13700 şi 23200 cm^{-1}, o absorbţie negativă mai slabă la 16000 cm^{-1} şi una pozitivă, de asemenea slabă, la 21000 cm^{-1}. Toate aceste benzi indică faptul că Ni(II) este într-o simetrie joasă atât în enzima pură, cât şi în complexul cu sulfonamidă [164].

Prin spectroscopie electronică şi DC au fost recent investigaţi aducţii Ni-AC cu următoarele sulfonamide IAC: acetazolamida, 4-fluorobenzensulfonamida şi sulfanilamida [134]. Datele obţinute confirmă rezultatele anterioare ale lui Bertini şi colab. [86, 164].

Ultimul colectiv de cercetători a studiat prin spectroscopie electronică şi aductul Cu-AC cu tosilamida [165]. Spectrul acestuia prezintă un singur maxim la 12500 cm^{-1}(ε = 115), datorat unei tranziţii *d-d* a ionului de Cu(II). Aceasta pare a indica o geometrie tetraedrică distorsionată a aductului Cu-AC-tosilamida, inhibitorul legându-se – ca şi în cazul celorlalţi derivaţi discutaţi – prin azotul grupării sulfonamidice ionizate [164, 165].

Spectrele RPE au fost investigate pentru aducţii Co-AC şi Cu-AC cu diverse sulfonamide IAC [120, 164, 165]. Astfel, spectrul aductului Co-AC cu acetazolamida, la pH 8,7, este redat în fig. 13A. Valorile parametrilor spectrali RPE pentru acesta sunt: g_1 = 5,8, g_2 = 2,6 şi g_3 = 1,7 [165b]. Acestea sunt elemente caracteristice pentru o geometrie tetraedrică a Co(II) şi sunt în concordanţă cu cele de spectroscopie electronică a aducţilor Co-AC cu sulfonamide [86, 164, 165].

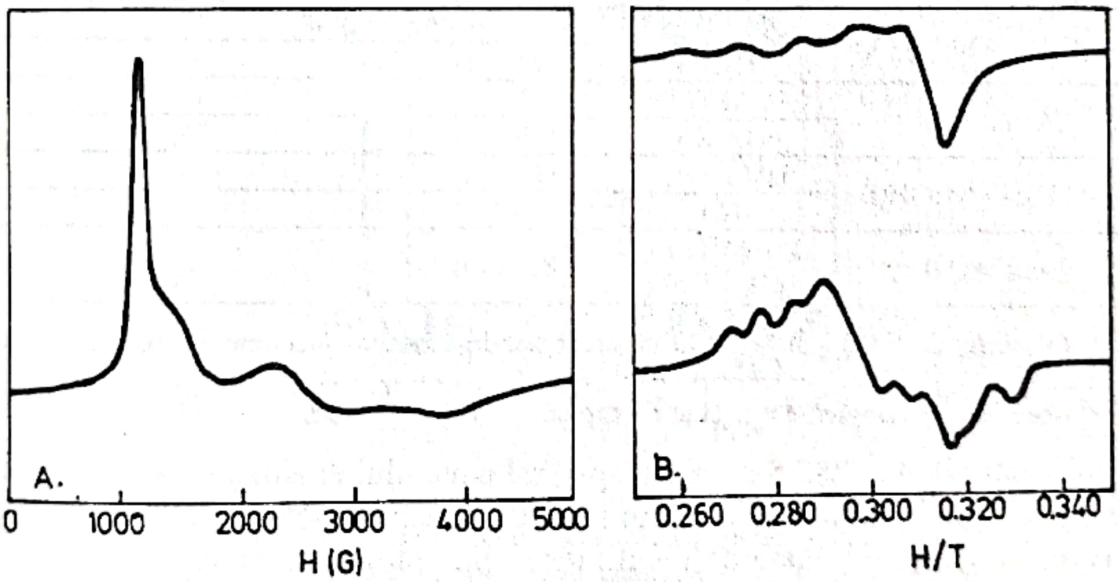


Fig. 13. Spectre de rezonanţă paramagnetică electronică (RPE) pentru aducţii: (A) Co-AC II cu acetazolamida [86d]; (B) Cu-AC II pură (sus) şi aductul său cu 4-toluensulfonamida (jos) [165a].

Spectrul aductului Cu-AC cu tosilamida la pH 9,5 este redat în fig. 13B [165a]. Cuplajele hiperfine observate în acesta (comparativ cu spectrul RPE al enzimei pure) sunt atribuite unei geometrii tetraedrice distorsionate a ionului de Cu(II) din aduct.

Ca şi în cazul inhibitorilor anionici (secţiunea 4.1.), spectroscopia RMN a furnizat importante date referitoare la legarea sulfonamidelor în situsul activ al AC. Enzimele utilizate în astfel de studii au fost: enzima nativă [137], Mn-AC [166], Co-AC [86, 164, 165], Ni-AC [86b, 134], Cu-AC [147,165] şi Cd-AC [167], iar

Scanned with OKEN Scanner

tehnicile folosite au inclus: ^{1}H-RMN (în sisteme dia- şi paramagnetice); ^{13}C-RMN; ^{15}N-RMN; ^{17}O-RMN; ^{19}F-RMN şi ^{111}Cd-RMN.

Studiile ^{13}C-RMN şi ^{15}N-RMN ale aducţilor tosilamidei cu enzima nativă (AC II bovină) la pH 6, realizate de Jarvet şi colab. [147] au demonstrat o interacţiune 1:1 a enzimei cu inhibitorul, acesta fiind legat în forma anionică. Mai mult, parametrii de relaxare ^{15}N-RMN au indicat prezenţa unor mişcări de vibraţie a inhibitorului în situsul activ al enzimei [147]. De menţionat că interacţia enzimă - sulfonamidă este un proces de schimb lent (*slow exchange*) pe scara de timp RMN [147]. În paralel, acest studiu a relevat şi faptul că rigiditatea complexului enzimă-inhibitor este mai mare comparativ cu cea a scheletului polipeptidic din enzima neinhibată.

Blackburn şi colab. au studiat prin spectroscopie ^{15}N-RMN şi ^{111}Cd-RMN legarea 4-fluorobenzensulfon[^{15}N]-amidei (**A**) şi 4-fluoro-N-hidroxi-benzensulfon[^{15}N]-amidei (**B**) de enzima substituită cu Cd(II) [167]. În tabelul 14 sunt redate deplasările chimice ^{15}N-RMN ale celor două sulfonamide IAC (**A** şi **B**) şi ale complecşilor lor cu enzima nativă.

Tabelul 14

Deplasări chimice ^{15}N-RMN ale unor sulfonamide marcate cu ^{15}N în soluţie şi complexate cu AC II bovină (enzima nativă) [167].

Sistem	Solvent	δ (ppm)*1, *2	Constante de cuplaj ^{15}N-^{1}H (Hz)
4-F-C_6H_4-SO_2NH_2 (A)	DMSO-d_6	–284,4 (*t*)	80
	H_2O	–290,5 (*s*)	–
(A) + AC II	0,05 M TRIS	–287,5 (*s*)	–
	(pH = 8,5)	–295,7 (*d*)	70
4-F-$C_6H_4SO_2NHOH$(B)	DMSO-d_6	–221,3 (*d*)	80
	H_2O	–220,9 (*s*)	–
(A) + AC II	0,10 M TRIS (pH = 7,5)	–220,1 (*s*)	–

*1 O soluţie de $^{15}NO_3^-$ a fost utilizată drept standard extern; spectrele au fost înregistrate la 40,56 MHz;

*2 Abrevieri: *s* = singlet; *d* = dublet; *t* = triplet.

Semnalul de la –287,5 ppm din spectrul aductului enzimei cu sulfonamida A a fost atribuit sulfonamidei libere (din soluţie), pe când dubletul de la –295,7 ppm, sulfonamidei ionizate (legate de ionul metalic). Faptul că semnalul este un dublet se datorează ionizării sulfonamidei (cu formarea anionului sulfonamidat) ca urmare a legării în situsul activ şi schimbului lent al protonului legat de azotul sulfonamidic complexat de Zn(II) cu protonii solventului (apă). În apă, cei doi protoni sulfonamidici se află în schimb rapid cu solventul, astfel încât nu se observă cuplaje ^{15}N-^{1}H.

N-hidroxisulfonamida B dă un semnal dezecranat cu 64 ppm (la –221,3 ppm), comparativ cu sulfonamida nesubstituită, datorită efectului atrăgător de electroni al grupării OH. Din nou, în DMSO ca solvent semnalul este triplet şi se observă cuplaje ^{15}N-^{1}H, pe când în apă cei doi protoni sulfonamidici sunt în schimb rapid cu solventul şi semnalul devine dublet (tabelul 14). Spectrul sulfonamidei B complexate de AC pune însă în evidenţă doar sulfonamida necomplexată datorită

Scanned with OKEN Scanner

faptului că ^{15}N are un timp de relaxare deosebit de lung, uneori de ordinul zecilor de secunde [167]. Mecanismul de relaxare al ^{15}N este denumit relaxare dipolară [168] şi implică existenţa unui nucleu cu spin 1/2 legat de atomul de azot. Când acest nucleu nu este prezent (cum este cazul sulfonamidei B ionizate, legate de enzimă), mecanismul de relaxare nu mai apare, astfel că semnalele devin foarte largi şi nu pot fi înregistrate în spectru [167]. Blackburn şi colab. [167] au utilizat spectroscopia ^{111}Cd-RMN pentru a dovedi că şi N-hidroxisulfonamida B se leagă de ionul metalic din situsul activ al enzimei.

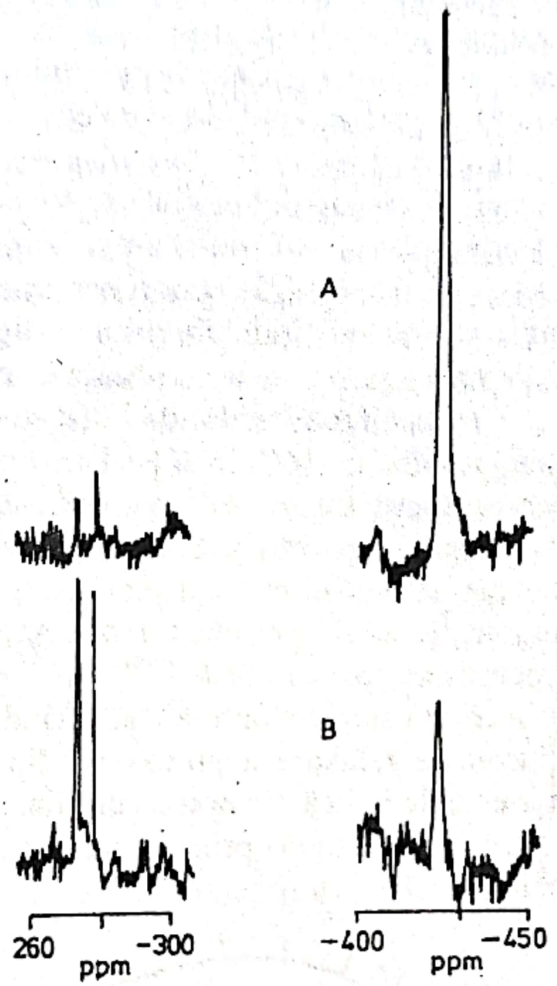


Fig. 14. Spectre ^{111}Cd-RMN ale aducţilor ^{111}Cd-AC II cu 4-fluoro-N-hidroxi-benzensulfon[^{15}N]amida: (A) concentraţia de enzimă şi de inhibitor este de 2,04 mM; (B) concentraţia de enzimă ca şi mai sus; concentraţia de inhibitor: 20,4 mM [167].

În fig. 14 sunt prezentate spectrele ^{111}Cd-RMN ale Cd-AC şi respectiv aductului cu N-hidroxisulfonamida B. Din figură se observă semnalul de la –423 ppm, care trebuie atribuit ionului de Cd(II) din enzima liberă (necomplexată). Adăugând un echivalent de inhibitor (B-), se remarcă apariţia unui dublet la -275 ppm, care creşte puternic în intensitate în momentul în care se mai adaugă 9 echivalenţi de inhibitor cu descreşterea concomitentă a semnalului enzimei necomplexate. Astfel, dubletul de la -275 ppm este atribuit complexului Cd-AC cu N-hidroxisulfonamida B; constanta de cuplaj ^{111}Cd-^{15}N de 249 ± 8 Hz (relativ mare) indică o legătură directă Cd-N deoarece cuplarea de spin în acest sistem atenuează puternic, mai ales când intervin şi alţi atomi între cele două nuclee [169].

Scanned with OKEN Scanner

Rezultate similare celor prezentate mai sus au fost obținute și în studii ^{111}Cd-RMN ale aducților Cd-AC cu sulfonamide aromatice nesubstituite [167, 168].

Recent, cercetările lui Gerig și colab. [170] au urmărit a elucida prin spectroscopie ^{19}F-RMN interacția benzensulfonamidelor substituite cu unul sau doi atomi de fluor la nucleul aromatic cu enzimele native umane AC I și AC II. Interacția enzimă-inhibitor se situează din nou în domeniul de schimb lent pe scala de timp RMN. Cercetările au permis a identifica efecte de deplasare chimică puternică, induse de legarea inhibitorului în situsul activ al enzimei, cât și efecte apreciabile de relaxare ale nucleelor ^{19}F (determinate prin ^{19}F-^{1}H NOE – unde NOE reprezintă efect nuclear Overhauser). Prin aceste studii se reconfirmă legarea inhibitorului în stare ionizată, prin atomul de azot coordinat la ionul de Zn(II). Ceea ce este surprinzător și unic doar pentru fluorobenzensulfonamide este faptul că în situsul activ al enzimei sunt legați doi moli de sulfonamidă. Ambele molecule de sulfonamidă sunt în stare ionizată, aflându-se în proximitatea ionului de Zn(II). Acest efect apare chiar și în cazul 2,5-difluorobenzensulfonamidei, substanță relativ voluminoasă comparativ cu ceilalți inhibitori investigați [170].

Experimentele RMN care vor fi trecute în revistă în cele ce urmează implică sisteme paramagnetice prin substituirea ionului de Zn(II) din enzima nativă cu ioni paramagnetici, ca de exemplu Mn(II), Co(II) sau Ni(II).

Întrucât Mn-AC are afinitate pentru sulfonamide mai redusă decât Zn-AC, sulfonamidele legate în situsul activ se vor afla în procese de schimb rapid cu sulfonamida liberă din soluție, la nivelul protonilor SO_2NH_2 sau SO_2NH^- aparținând inhibitorului. Experimentele ^{1}H-RMN pe aductul Mn-AC cu sulfacetamida (N^1-acetil-sulfanilamida) au permis calcularea distanței diverșilor protoni ai inhibitorului față de ionul de Mn(II). Aceste calcule s-au realizat ținând cont de efectul ionului paramagnetic asupra vitezei de relaxare a protonilor din molecula inhibitorului [166]. Rezultatele acestor calcule indică din nou o coordinare directă a inhibitorului (cu gruparea sulfonamidică nesubstituită) prin atomul de azot la ionul de Mn(II) din situsul activ al enzimei (fig. 15) [166].

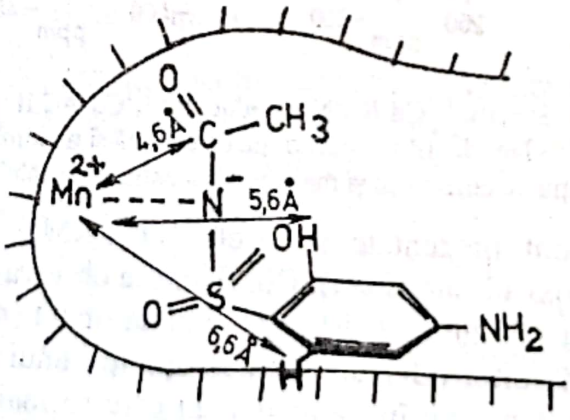


Fig. 15. Legarea N1-acetilsulfanilamidei de Mn-AC și distanța (în A) dintre ionul de Mn(II) și diferiți protoni din molecula inhibitorului (vezi textul pentru detalii) [105b].

La pH alcalin, atât Co-AC, cât și Mn-AC relaxează protonii solventului (apa), care sunt în schimb rapid cu molecula de apă/ionul HO^- coordinat de ionul metalic din situsul activ al enzimei (Secțiunea 4.1.) [86, 171]. Prin legarea sulfonamidelor

Scanned with OKEN Scanner

de aceste metaloenzime, procesele de relaxare menţionate sunt complet anihilate, ceea ce semnifică că sulfonamida dislocuieşte apa legată de ionul metalic, prind accesul solventului la acesta [171].

Studii ^{1}H-RMN pe Co-AC au fost realizate pe aducţii cu următoarele sulfonamide: acetazolamida [86b], 4-toluensulfonamida ($TsNH_2$), sulfanilamida [126], N-hidroxitosilamida (TsNHOH), N-metoxitosilamida (TsNHOMe), tosilhidrazida ($TsNHNH_2$) şi alte câteva sulfonamide N-modificate [164d]. În toate situaţiile, spectrele ^{1}H-RMN sunt tipice pentru Co(II) în geometrie tetradrică (secţiunea 4.1.) cu inhibitorul în stare anionică, legat direct ce ionul de Co(II) prin intermediul atomului de azot sulfonamidic, cu o singură excepţie descrisă în continuare.

Spectrul aductului Co-AC II cu acetazolamida [86b] este similar cu cel al aductului cu cianat (Secţiunea 4.1.) ceea ce indică o similitudine a geometriei ionului metalic din cei doi complecşi şi o coordinare prin atomul de azot ionizat, în ambele cazuri. În astfel de complecşi pseudo-tetradrici, deplasările izotropice ale protonilor imidazolici din histidinele coordinate de Co(II) sunt mai mici. Concomitent, semnalele sunt mai largi comparativ cu cele din spectrele în care Co(II) este pentacoordinat (ca de exemplu în aducţii cu oxalat, tiocianat, nitrat, perclorat etc.) [86].

Un caz unic printre sulfonamidele investigate prin RMN pe Co-AC îl ocupă N-metoxi-4-toluensulfonamida (TsNHOMe), recent investigată de noi [164d]. Spectrul acestui aduct prezintă *şapte* semnale deplasate izotropic, între 48 şi 68 ppm, ceea ce nu a mai fost evidenţiat până în prezent la legarea altor inhibitori (fig. 16).

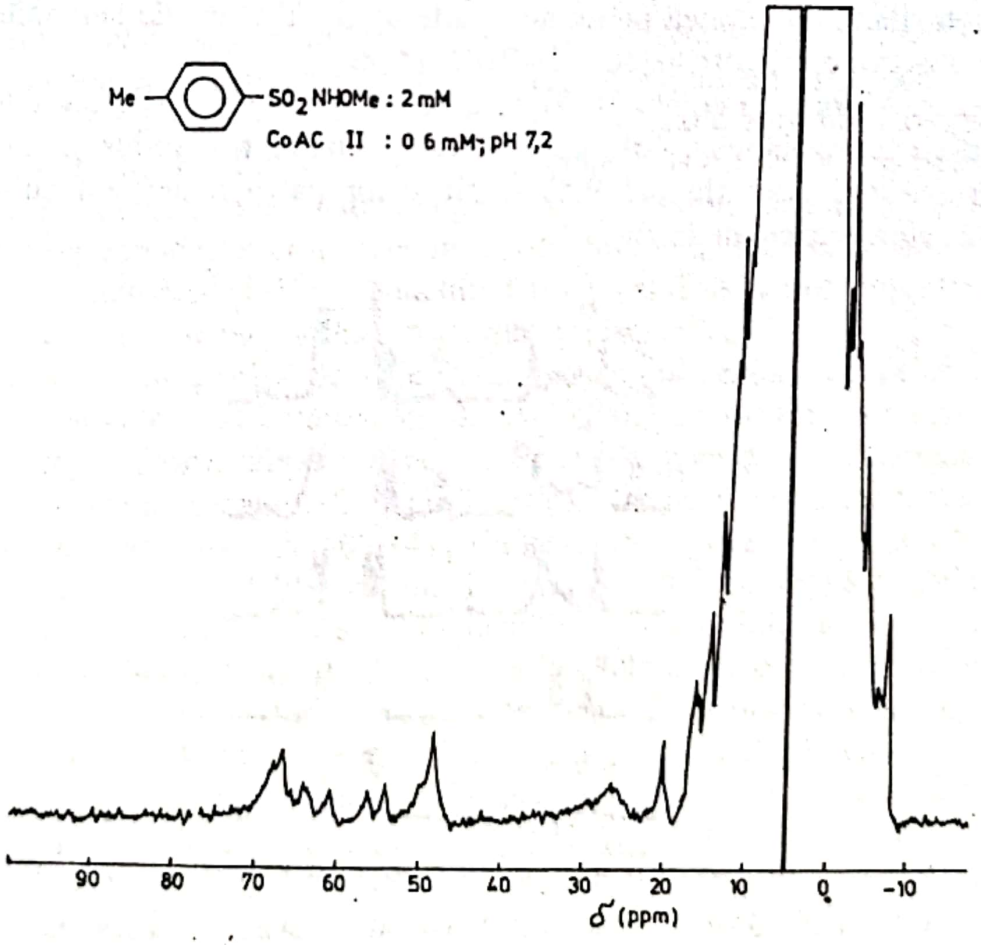
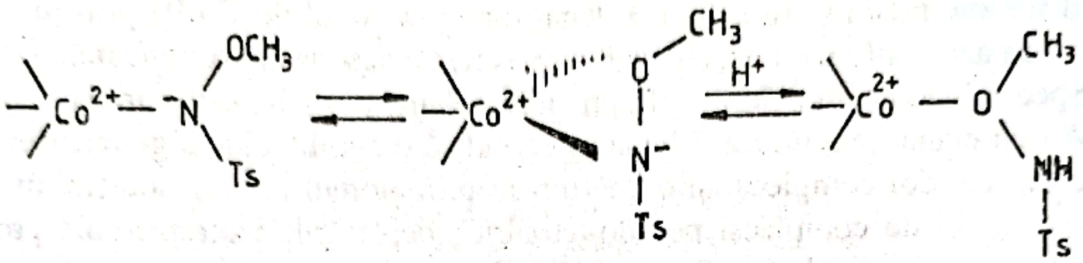


Fig. 16. Spectrul 1H-RMN la 200 MHz a aductului Co-AC II bovine cu N-metoxitosilamida, în apă, la 25° C.

Scanned with OKEN Scanner

Prin înregistrarea spectrului la pH acid (5,5 – când enzima se găseşte sub forma acidă, pentacoordinată), patru dintre aceste semnale dispar, rămânând doar cele de la 48,4; 66,4 şi 67,6 ppm. Spectrul înregistrat în D_2O prezintă un singur semnal, la 48,2 ppm, atribuit protonului imidazolic de tip *meta* din His-119 coordinată la Co(II). Rezultă că celelalte semnale, cuprinse între 54,0 şi 67,6 ppm, aparţin protonilor imidazolici NH din cele trei resturi de histidină coordinate de Co(II) şi că practic există mai multe specii ale aductului enzimă-inhibitor care apar datorită diverselor moduri de coordinare ale inhibitorului (Schema 5).



Ts = 4-CH_3-C_6H_4-SO_2-

Schema 5

Intermediarul care favorizează legarea prin azot şi respectiv oxigen este pentacoordinat, ceea ce nu a mai fost evidenţiat pentru alte sulfonamide [164d]. Vecinătăţile magnetice diferite la coordinarea prin azot şi respectiv prin oxigen a N-metoxi-tosilamidei explică pe de altă parte numărul mare de semnale deplasate izotropic observate în acest spectru ^{1}H-RMN [164d].

Recent, Moratal şi colab. [135] au efectuat studii ^{1}H-RMN ale aducţilor Ni-Ac bovine cu acetazolamida, 4-fluorobenzensulfonamida, tosilamida şi sulfanilamida. Spectrele enzimei pure (la pH 9,5) şi ale celor patru aducţi cu sulfonamidele menţionate sunt prezentate în fig. 17.

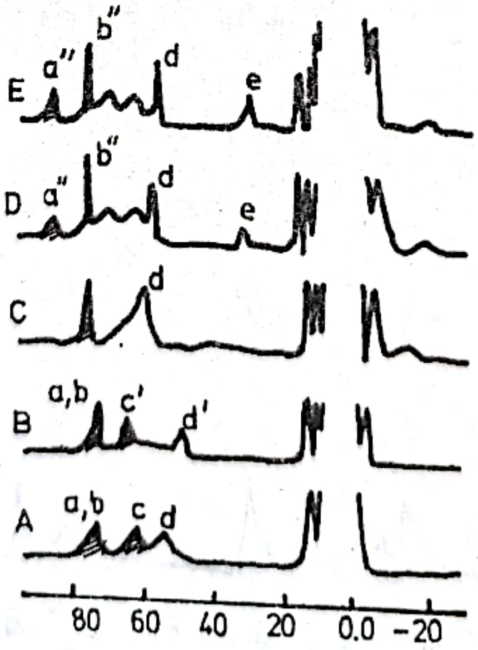


Fig. 17. Spectre ^{1}H-RMN la 200 MHz ale (A) Ni-AC II bovine; (B) aductul cu acetazolamida; (C) aductul cu 4-fluorobenzensulfonamida; (D) aductul cu tosilamida; (E) aductul cu sulfanilamida (concentraţia de enzimă este cuprinsă între 3-4 mM în toate cazurile; pH 9,5 , la 20 °C) [135].

Scanned with OKEN Scanner

Se observă că enzima pură (A) prezintă patru semnale bine rezolvate, deplasate paramagnetic spre câmpuri joase, situate la 76,1 (a), 73,7 (b), 62,6 (c) şi 54,5 (d) ppm. Aceste semnale corespund celor patru protoni de tip *meta* din histidinele coordinate de Ni(II). În D_2O ca solvent, semnalele a, b, c dispar, motiv pentru care acestea sunt atribuite celor trei protoni NH imidazolici ai acestor resturi de histidină. Semnalul care nu schimbă în D_2O, de la 54,5 ppm, este atribuit protonului Hδ2 din His-119 (vezi şi discuţia spectrelor RMN ale Co-AC din secţiunea 4.1.). În spectrul menţionat se identifică de asemenea semnale largi, în domeniul 45-65 ppm, probabil datorate protonilor de tip *orto* din histidinele coordinate. Spectrul aductului cu acetazolamida (B) nu diferă marcant de cel al enzimei pure, producându-se însă modificări ale semnalelor c şi d. Aceasta demonstrează că Ni(II) continuă să coordineze resturile de His ale enzimei prin legarea inhibitorului. Modificări mai importante apar însă în spectrele ^{1}H-RMN ale aducţilor Ni-AC cu derivaţii de benzensulfonamidă deja menţionaţi (compuşii C-E). Astfel, se produc deplasări ale unor semnale din aceste spectre spre câmpuri şi mai joase. Deoarece Ni-proteinele au fost mult mai puţin investigate comparativ cu Co-proteinele, în prezent nu este posibil să se determine cu precizie geometria ionului de Ni(II) de la situsul activ al acestei enzime. Rezultatele experimentale de până acum permit însă a afirma că inhibitorul interacţionează în acelaşi mod ca şi cu ionul de Co(II) din Co-AC sau ionul de Zn(II) din enzima nativă.

Prin experimente ^{17}O-RMN pe Cu-AC I, Bertini şi colab. [147] au determinat un efect de mărire a vitezelor de relaxare transversale ale nucleelor ^{17}O din apă, în aducţii enzimei cu diverşi inhibitori.

Pentru unele sulfonamide cum ar fi tosilamida, sulfaniamida şi acetazolamida nu s-a evidenţiat însă efectul de mărire a vitezei de relaxare, spre deosebire de aducţii Cu-AC cu anioni precum I^-, N_3^- etc. Drept consecinţă a acestui fapt în aducţii cu aceste sulfonamide nu a fost posibilă stabilirea geometriei de coordinare a Cu(II) (tetraedrică sau trigonal-bipiramidală) prin metoda RMN amintită. Corelând însă datele de spectroscopie electronică şi RPE a aducţilor Cu-AC cu diverse sulfonamide, s-a admis că ionul de Cu(II) este tetracoordinat în aceşti complecşi [86, 164].

Tehnica cristalografiei de raze X a furnizat informaţii deosebit de exacte referitoare la legarea sulfonamidelor de AC. Până în prezent au fost raportate structurile complecşilor izozimei umane AC I cu sulfanilamida şi acetazolamida [172], precum şi ai izozimei umane AC II cu 3-acetoximercuri-4-aminobenzensulfonamida [95,149] şi cu acetazolamida [68,141] (la rezoluţii foarte bune, de 1,9-2 A). În cazul clorazolamidei, Lindahl şi colab. [141] nu au reuşit să obţină cristale potrivite pentru experimentele de raze X ale complexului enzimă-inhibitor.

Experimentele efectuate au condus însă la emiterea unei concluzii concordante: pentru ambele izozime, inhibitorul se leagă prin intermediul atomului de azot sulfonamidic, direct de ionul de Zn(II), dislocuind molecula de apă/ionul hidroxil coordinat de acesta. În urma legării sulfonamidei geometria ionului de Zn(II) nu se schimbă, rămânând tetraedrică. Gruparea NH^- a inhibitorului formează încă o legătură de hidrogen cu atomul de oxigen al grupării OH din Thr-199, în timp ce unul dintre atomii de oxigen sulfonamidici dislocuieşte molecula de apă „adâncă" din situsul activ al enzimei. Cei doi atomi de oxigen ai grupării SO_2 sunt la o distanţă de 3,2 şi respectiv 4,1 A de ionul de Zn(II). Interacţia restului moleculei

Scanned with OKEN Scanner

inhibitorului cu situsul activ depinde de grupările grefate pe inelul aromatic/heterociclic al acestuia. Astfel, în complexul AC II cu acetoximercuri-sulfanilamida, atomul de mercur este în proximitatea restului His-64 de la intrarea în situsul activ, iar nucleul benzenic este situat spre partea hidrofobă a situsului, fiind în contacte van der Waals cu următoarele resturi de aminoacizi: Gln-92, Val-121, Leu-198 şi Thr-200. Pe de altă parte, în cazul complexului acetazolamidei cu AC II, se constată că gruparea SO_2NH^- a inhibitorului legat suferă o rotaţie cu 120° comparativ cu conformaţia acestei grupări din sulfonamida necomplexată. De asemenea, gruparea carbonil din restul acetil al inhibitorului formează o legătură de hidrogen cu gruparea NH_2 a restului Gln-92 şi dezvoltă contacte van der Waals cu resturile de aminoacizi menţionate mai sus. Motivul pentru care se pare că izozima AC III are o afinitate atât de mică pentru sulfonamide, comparativ cu celelalte izozime ale AC (tabelul 11), este faptul că restul Leu-198 din izozimele I şi II (important pentru interacţia enzimei cu inhibitorii sulfonamidici) este substituit cu Phe în AC III, care fiind deosebit de voluminos, împiedică steric accesul inhibitorului spre situsul activ al enzimei, mai precis spre ionul de Zn(II) [68, 141].

4.3. Inhibiţia dual㠄

La începutul ultimului deceniu, după 1990, Supuran şi colab. [104] au raportat inhibitori duali ai AC. Aceştia sunt reprezentaţi de complecşi ai sulfonamidelor aromatice/heterociclice cu cationi tranziţionali sau din grupele principale; modalităţile de obţinere, proprietăţile şi mecanismul de inhibiţie sunt prezentate în secţiunea 6.

Mecanismul de acţiune al acestor inhibitori complecşi implică interferenţa cu ambele etape ale mecanismului catalitic al AC (ecuaţiile 9 şi 10, vezi secţiunea 3), de unde şi denumirea propusă pentru această nouă clasă de inhibitori [104].

Determinându-se constantele de stabilitate ale acestor inhibitori complecşi [173], s-a constatat că în mediu apos aceştia disociază uşor în anioni sulfonamidici şi cationi. În tabelul 15 sunt prezentate câteva valori ale constantelor de stabilitate ale unor complecşi ai etoxzolamidei şi respectiv acetazolamidei, recent determinate [173].

Tabelul 15

Constante de stabilitate ale unor complecşi conţinând sulfonamide ca liganzi (AAZ - anionul acetazolamidei; EZA - anionul etoxzolamidei)

Complex[a]	lg K_s	Ref.[c]
[Zn(AAZ)]	3.99	173b
[Zn(EZA)$_2$]	8.42	173a
[Co(AAZ)$_2$]	8.04	173b
[Zn(AAZ)$_2$]	8.16	173b
[Ni$_2$(AAZ)$_3$(OH)]	4.75	173b
[Cu(AAZ)$_2$][b]	7.82	173b
[Cu(AAZ)]	7.62	173b
[Cu(EZA)$_2$][b]	9.21	173a
[Cu(EZA)]	6.10	173a
[Pd(EZA)]	2.8	173a

[a] Constante globale de stabilitate (pentru echilibrul $ML_n \rightleftharpoons M + nL$);

[b] Constanta parţială de stabilitate (pentru echilibrul $ML_n \rightleftharpoons ML_{n-1} + L$) (în formulele de mai sus s-a neglijat sarcina cationului şi a anionilor sulfonamidici);

[c] Constantele determinate în ref.[173a] au fost obţinute în 50% DMSO-apa (*v/v*); iar cele din ref. [173b] în 50% etanol-apă (*v/v*).

Scanned with OKEN Scanner

Anionii sulfonamidici şi respectiv cationii formaţi în urma disocierii inhibitorilor complecşi în soluţie, interferă apoi cu principalele două etape ale mecanismului catalitic al enzimei [173a]. Ionii metalici se leagă probabil în vecinătatea restului imidazolic al His-64 (transportul de protoni al enzimei) şi împiedică procesele de transfer al protonilor, facilitate de acest rest. Prin contrast, anionii sulfonamidici se leagă direct de ionul de Zn(II) din situsul activ al enzimei, analog cu inhibitorii sulfonamidici tipici.

Acest mecanism de acţiune explică potenţa neobişnuită a acestor inhibitori, care este în anumite cazuri de 10^2-10^3 ori mai eficace comparativ cu cea a sulfonamidelor de la care derivă [104] (Secţiunea 6).

4.4. Inhibitori competitivi cu CO_2

Toţi inhibitorii discutaţi în secţiunile 4.1.–4.3. sunt non-competitivi în legarea CO_2 şi competitivi cu legarea bicarbonatului de enzimă [16]. Până în prezent, sunt cunoscuţi doar puţini inhibitori competitivi cu CO_2 ai anhidrazei carbonice.

Astfel, Khalifah [72a] a descoperit în 1971 că imidazolul (dar nu şi N-metil-imidazolul sau 1,2-dimetil-imidazolul) este unicul inhibitor competitiv cu CO_2 al izozimei AC I (umană), fără a inhiba izozima AC II (umană sau bovină). Constanta de inhibiţie a imidazolului pentru AC I este K_I = 20 mM [72a]. Particular imidazolului este că afinitatea sa pentru enzimă este independenţa de pH [174], ceea ce nu s-a constatat pentru nici un alt inhibitor de AC.

Recent, interacţia AC I cu imidazolul a fost investigată de Luchinat şi colab. [133] prin spectroscopie ^{1}H- şi ^{13}C-RMN asupra enzimei native şi substituite cu Co(II). Determinările au reconfirmat inhibiţia competitivă cu CO_2 a imidazolului, cu $K_I = 38 \pm 2$ mM la pH 6,8; şi respectiv $K_I = 27 \pm 2$ mM la pH 8,8 [133]. Spre deosebire de enzima nativă, legarea imidazolului de Co-AC I este dependentă de pH, putându-se forma doi aducţi. Până în prezent, interacţia imidazolului cu AC I nu este elucidată, ca mecanism, în toate detaliile [133], mai ales ţinând cont că imidazolul şi unii derivaţi ai săi sunt activatori deosebit de eficace ai izozimei AC II [175, 176]. Rezultatele studiului lui Luchinat şi colab. [133] au evidenţiat că la pH scăzut legarea imidazolului este facilitată de anioni anorganici, ca de exemplu sulfatul, când se obţine un complex ternar, AC I–imidazol–SO_4^{2-}, în care ionul de Co(II) este pentacoordinat. Aceasta ar explica pentru ce în structura de raze X a aductului AC I cu imidazol – obţinută la o rezoluţie nu foarte bună, de 3 Å, aductul fiind preparat la o concentraţie mărită de sulfat de amoniu [177], imidazolul apare la o distanţă mai mare de ionul de Zn(II), comparativ cu alţi aducţi enzimă-inhibitor investigaţi (vezi secţiunile 4.1. şi 4.2). Această coordinare este de fapt confirmată atât de studiul spectroscopic al lui Luchinat şi colab. [133], cât şi de date de spectroscopie electronică pe Co-AC [86].

Pentru izozima AC II sunt cunoscuţi mai mulţi inhibitori competitivi cu CO_2 ca substrat, divizaţi în două clase: fenolii cu unii derivaţi ai lor şi diverşi azoli (exceptând imidazolul).

Scanned with OKEN Scanner

Simonsson şi colab. [103] au raportat în 1983 că fenolul este inhibitor competitiv cu CO_2 pentru izozima AC II umană, fiind non-competitiv mixt în raport cu bicarbonatul ca substrat [72b]. Se presupune [103] că fenolul, ca şi 2-nitrofenolul (un alt inhibitor competitiv cu CO_2 al acestei enzime) se leagă în stare neutră de forma bazică (EZn^{2+}-OH^-) a enzimei, în buzunarul hidrofob la care se leagă şi molecula de CO_2 [103]

Tetrazolul, 1,2,3-triazolul şi 1,2,4-triazolul la pH scăzut sunt, de asemenea, inhibitori competitivi cu CO_2 ai AC II [72b, 112b, 164b]. Aceşti inhibitori au fost investigaţi asupra Co-AC II (umane şi bovine) de către colectivul de cercetători condus de Bertini [112b]. Se pare că aceşti compuşi se pot lega atât în stare neutră, cât şi ca anioni azolat de ionul metalic din situsul activ al enzimei [164b].

Deşi tiofenolii nu au fost testaţi ca inhibitori ai AC, 2-amino-5-mercapto-1,3,4-tiadiazolul a fost raportat recent de Brezeanu şi colab. [178] ca fiind inhibitor competitiv al AC II, cu o valoare IC_{50} de 89 μM. În aceeaşi ordine de idei, de notat ca 2-mercaptoetanolul (posedând, de asemenea, o grupă SH, ca şi compusul menţionat anterior) a fost raportat ca fiind inhibitor al Ni-AC, fără a se specifica însă tipul de inhibiţie [179].

Scanned with OKEN Scanner

5. SULFONAMIDELE CA INHIBITORI AI ANHIDRAZEI CARBONICE

Descoperirea de către Domagk [180], în 1932, a activității antibacteriene a prontosilului, un derivat de sulfanilamidă şi introducerea în clinică cu succes a unui număr relativ mare de sulfonamide antibacteriene [181], reprezintă un exemplu clasic de interrelație benefică chimie organică-biochimie-medicină, care a condus nu numai la progrese intelectuale şi medicale notabile, ci şi la tratamente utile multor bolnavi.

Astfel, pornindu-se de la structura relativ simplă a sulfanilamidei (4-aminobenzensulfonamida **1**), au fost descoperite cinci tipuri de compuşi cu acțiune biologică diferită:

1) sulfonamidele antibacteriene;
2) sulfonamidele inhibitoare ale anhidrazei carbonice (IAC);
3) sulfonamidele antidiabetice (hipoglicemiante);
4) triazidele şi diureticele de ansă;
5) medicamentele antitiroidiene [154].

În prezent, o parte din aceşti compuşi intră în conținutul unor medicamente cu utilizări multiple, ca de exemplu: antihipertensivele, medicamentele antibacteriene, antidiabeticele hipoglicemiante, unele tipuri de antiulceroase, medicamentele antiglaucomatoase etc. [182]. Pentru majoritatea acestor compuşi biologic activi sunt cunoscute deja mecanismele de acțiune la nivel molecular [154a].

Întrucât scopul acestei lucrări este de a expune sub diverse aspecte doar clasele de sulfonamide cu acțiune de inhibiție a activității AC, în această secțiune vor fi trecute în revistă metodele de preparare şi proprietățile fizico-chimice în corelație cu efectele lor biologice, relațiile structură chimică – activitate biologică (atât din punct de vedere calitativ, cât şi cantitativ), precum şi domeniile principale de aplicabilitate ale unor astfel de inhibitori enzimatici. Utilitatea practică a unor reprezentanți ai compuşilor menționați aici va fi examinată *in extenso* în secțiunile 7 şi 8.

5.1. Inhibitori clasici

5.1.1. Sulfonamidele aromatice

Inhibiția AC cu sulfanilamidă, descoperită de Mann şi Keilin [10], în 1940, a marcat începutul unei perioade caracterizate prin importante descoperiri medicale, dintre care unele deja au fost menționate în introducerea acestei secțiuni. Descoperirea celor doi savanți englezi [10] a oferit o explicație şi pentru anumite

Scanned with OKEN Scanner

particularități de răspuns terapeutic observate la pacienții tratați cu sulfanilamidă ca medicament antibacterian, și anume, că sângele acestora avea o putere mult diminuată de a transporta CO_2 și că drogul se lega puternic de eritrocite [183].

Scurt timp după aceea, biochimistul american Krebs [184] demonstrează că astfel de proprietăți posedă doar sulfonamidele nesubstituite la gruparea SO_2NH_2. Pentru compușii posedând grupări de tipul $-SO_2NHR$ (unde R = acil, alchil, aril etc.) capacitatea de a inhiba enzima AC este mult redusă. Din acest motiv, majoritatea sulfonamidelor antibacteriene care posedă grupări sulfonamidice substituite nu sunt inhibitori eficace ai AC. De asemenea, Krebs [184] a evidențiat și capacitatea unor coloranți azoici, derivați de sulfanilamidă (de tipul **2**; pentru formule vezi secțiunea 4.2.) de a inhiba activitatea AC.

O etapă distinctă, ulterioară în obținerea de IAC, a reprezentat-o sinteza de sulfonamide derivate de la hidrocarburi aromatice mono- sau policiclice. Capacitatea compușilor obținuți de a inhiba AC era testată pe o enzimă crudă, izolată din sânge, care conținea cel puțin două izozime, AC I și AC II. În studiul sistematic al lui Beasley și colab. [185], care au raportat o serie mare de inhibitori de tipul sulfonamidelor aromatice, s-au evidențiat următoarele caracteristici ale inhibitorilor:

1) derivații 4-substituiți ai benzensulfonamidei, de tipul **4**, cât și difenil-4-sulfonamida (**4c**) sunt inhibitori mai eficienți decât sulfonamidele derivate de la naftalină;

2) substituenții din poziția 4, care induc activități bune de IAC (în compușii de tipul 4) au fost: halogenii; grupările acetamido, alcoxicarbonil, aminometil etc. O mențiune specială o merită esterii acidului 4-sulfamoil-benzoic, de tipul **4g-n** (tabelul 16), care se numără printre cei mai activi IAC raportați; după cum s-a arătat în secțiunea 4.2., viteza de asociere a inhibitorului cu AC este determinantă pentru inhibiția globală a enzimei, ori pentru compușii de acest tip (deosebit de liposolubili) Maren [154] a demonstrat că asocierea este deosebit de rapidă, cu constante cinetice de ordinul a 10^7–10^8 s^{-1} (tabelul 13, secțiunea 4.2.);

3) Benzensulfonamidele-2-substituite: 2,4- și/sau 3,4-disubstituite sunt în general inhibitori mult mai slabi (pentru izozima AC II) comparativ cu benzensulfonamidele-4-substituite;

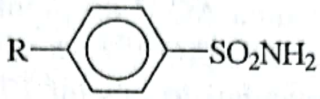
4) Activități de buni inhibitori, dar și proprietăți fizico-chimice avantajoase (ca de exemplu, hidrosolubilitate mărită) se constată pentru compușii de tipul **4**, posedând substituenți ca: hidrazido-; ureido; tioureido; aminometil [154, 185, 186].

Recent, în scopul obținerii de compuși pentru radiomarcarea selectivă a eritrocitelor -tehnica paraclinică de diagnostic din medicina nucleară [187]- utilizând abordarea principiului „enzimă-inhibitor", Singh și Wyeth [187] au raportat inhibitori de tipul **5**. Astfel de inhibitori posedă resturi lipofile și atomi de halogen cu reactivitate mărită în molecula lor. Aceștia pot reacționa cu anumite grupări din resturile de aminoacizi ale situsului activ (imidazolul din histidine, gruparea mercapto din cisteine etc.), inducând o inactivare ireversibilă a enzimei prin modificări covalente ale acesteia.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 16

Date de inhibiţie a AC II cu derivaţi substituiţi ai benzensulfonamidei (determinate prin metoda Maren [201] şi tehnica E-I, adică prin preincubarea soluţiilor de enzimă şi inhibitor)

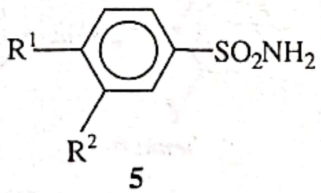


4

4	R	$IC_{50}\times10^{-8}$ (M)	Ref.
a	H	30	185
b	NH_2	95	16
c	Ph	2.6	185
d	Cl	19	185
e	Br	10	185
f	I	1,4	185
g	COOH	26	185
h	COOMe	1,1	185
i	COOEt	0,6	185
j	COO*n*Bu	0,1	285
k	COO-n-C_6H_{13}	0.05	185
l	COO-n-C_9H_{19}	0.04	185
m	$COOCH_2Ph$	0.032	185
n	$COOCH_2CH_2OH$	1.0	185
o	$CONH_2$	24	185
p	$CONHNH_2$	18	185
q	$NHCONH_2$	27	185
r	$NHCSNH_2$	28	185, 186
s	CH_2NH_2	10	16, 154b

Tabelul 17

Date de inhibiţie ale izozimelor AC I şi AC II umane cu derivaţi de benzensulfonamidă, preparaţi ca agenţi de radiomarcare selectivă a eritrocitelor [187] (valorile IC_{50} au fost determinate pentru inhibarea activităţii esterazice a AC cu 4-nitrofenilacetat ca substrat)



5

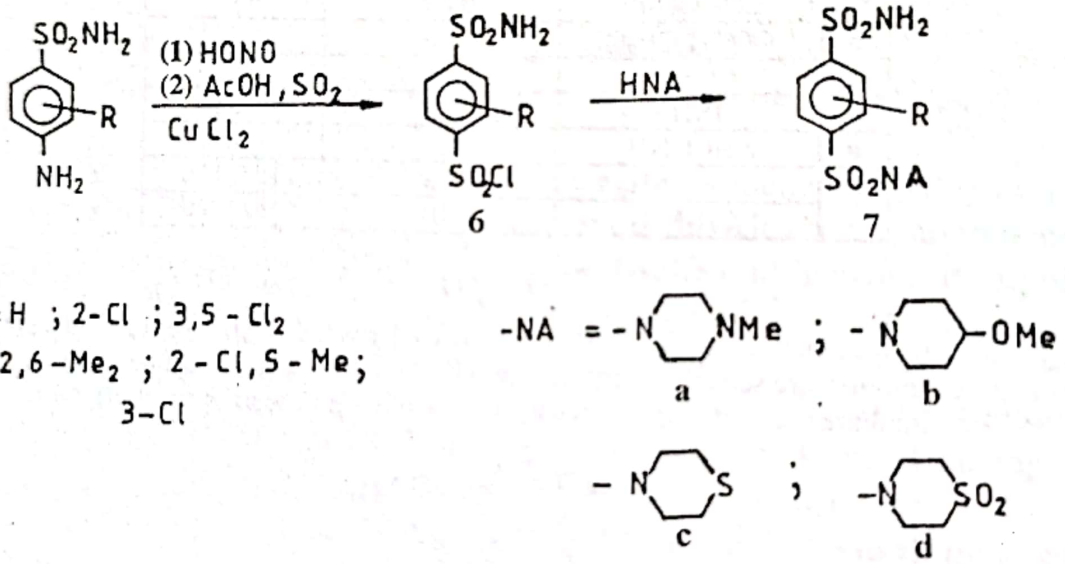
5	R^1	R^2	$IC_{50}\times10^{-7}$ (M)	
			AC I	AC II
a	4-I-$C_6H_4NHSO_2$–	H	0.6	0.05
b	4-I-$C_6H_4SO_2NH$–	H	1.7	2.3
c	4-I-C_6H_4S–	H	1.5	0.04
d	4-I-$C_6H_4SO_2$–	H	0.18	0.001
e	$ClCH_2CONH$–	H	1.1	0.9
f	$ClCH_2CONH$–	I	0.9	1.1
g	$BrCH_2CONH$–	H	1.0	0.9
h	ICH_2CONH–	H	0.4	0.2
i	H	$ClCH_2CONH$–	34	–
j	H	ICH_2CONH–	25	–
k	I	ICH_2CONH–	15	0.7

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul 17 sunt prezentaţi câţiva inhibitori de acest tip împreună cu datele de inhibiţie ale celor două izozime eritrocitare, AC I şi AC II. Compararea datelor prezentate permit a susţine că izozima AC II este mult mai uşor inhibată de aceste sulfonamide comparativ cu izoenzima AC I, care este mai rezistentă la inhibiţie. Totuşi, unii dintre inhibitorii prezentaţi în tabelul 17 au aproape aceeaşi afinitate pentru cele două izozime (de exemplu, compuşii **5b**, **e-h**). Dintre compuşii sintetizaţi, doar unul singur, **5k**, a provocat o inactivare ireversibilă, rapidă, a izozimelor AC I şi AC II. Rezultatul a fost obţinut probabil printr-o reacţie de alchilare a restului de imidazol din His-64, în situsul activ al acestor izozime, în care este implicată gruparea 3-iodo-acetamido a inhibitorului [187].

Compuşii de tipul **4** şi **5** au fost preparaţi din clorurile de aril-sulfonil corespunzătoare (prin amidare) sau din aceşti compuşi şi anilinele substituite corespunzătoare (compuşii **5a-d**) [185-187].

În scopul obţinerii de compuşi care să acţioneze ca inhibitori specifici ai AC din creier, dar să fie şi cerebrovasodilatori selectivi – (sectiunea 5.2.2.), Cross şi colab. [188] au preparat după cum este prezentat în schema 6, benzensulfonamide disubstituite, de tipul **7**, pornind de la sulfanilamide substituite.



Schema 6

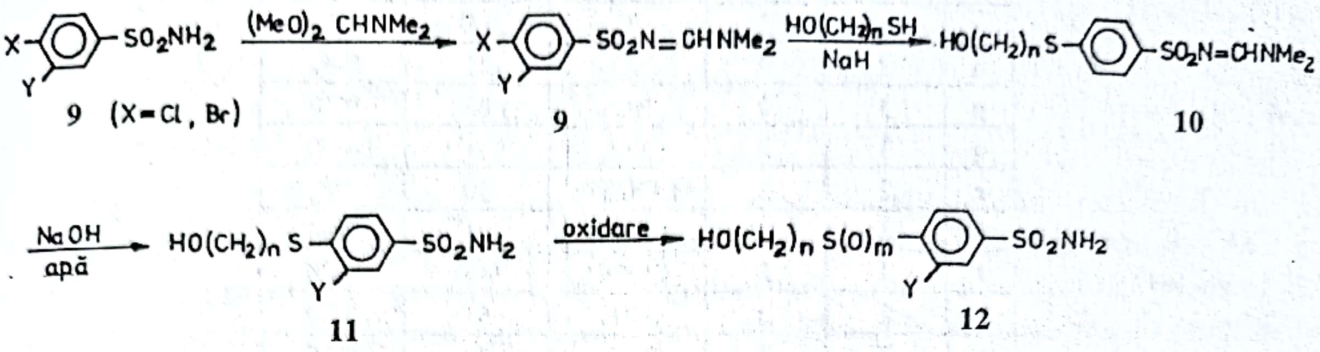
Inhibitorii de acest tip au prezentat valori IC_{50} de ordinul a 10^{-7} M. Unul dintre ei (**7b**: R = 2-Cl) a prezentat acţiune anticonvulsivantă la şobolani, care a fost acompaniată doar de un uşor efect diuretic [188].

În scopul obţinerii unor sulfonamide cu efect topic, ca medicamente antiglaucomatoase, Shepard şi colab. [189] au preparat derivaţi de hidroxialchilsulfonil-benzensulfonamidă, de tipul **11** şi **12** (schema 7).

Deoarece benzensulfonamidele 4-cloro-/4-bromo-substituite reacţionează deosebit de greu cu diverşi nucleofili, a fost necesară protejarea grupării sulfonamidice sub forma grupării sulfonilformamidino [190]. Protecţia a fost realizată prin intermediul dimetilacetalului dimetilformamidei. Compuşii **9** preparaţi în acest fel, trataţi cu hidroxi-tioli, în mediu anhidru, în prezenţa NaOH, au fost convertiţi prin reacţii de substituţie nucleofilă aromatică în hidroxialchil-

Scanned with OKEN Scanner

tioderivații **10**. Deprotejarea acestora a fost realizată în mediu bazic, cu obținerea sulfonamidelor corespunzătoare **11**.



Schema 7

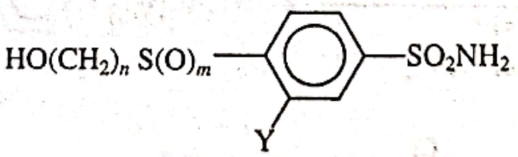
Oxidarea sulfurilor **11** la sulfonele **12** s-a realizat cu peroxid de hidrogen în acid acetic glacial; acid 3-cloroperoxibenzoic în acetat de etil sau oxonă în mediu apos [189].

Dintre toți derivații de benzensulfonamidă de tipul **8** investigați de Shepard și colab.[189] doar 3-cloro-4-nitrobenzensulfonamida a reacționat cu mercapto-alcooli în soluție apoasă (în prezență de acetat de sodiu) sau în soluție alcoolică (în prezență de trietilamină). Această reacție de tip SN aromatică este facilitată de efectul labilizant al grupării nitro în *orto* față de atomul de halogen substituit. Mai mult, în acest unic caz, nu a mai fost necesară protejarea grupării SO_2NH_2, ca și în cazul altor derivați investigați.

Compușii de tipul **12** preparați în felul acesta au dovedit proprietăți bune de IAC (tabelul 18).

Tabelul 18

Inhibiția AC II umane cu sulfonamide aromatice de tipul 12, și valori pK_a pentru gruparea SO_2NH_2, a inhibitorilor [189]



12

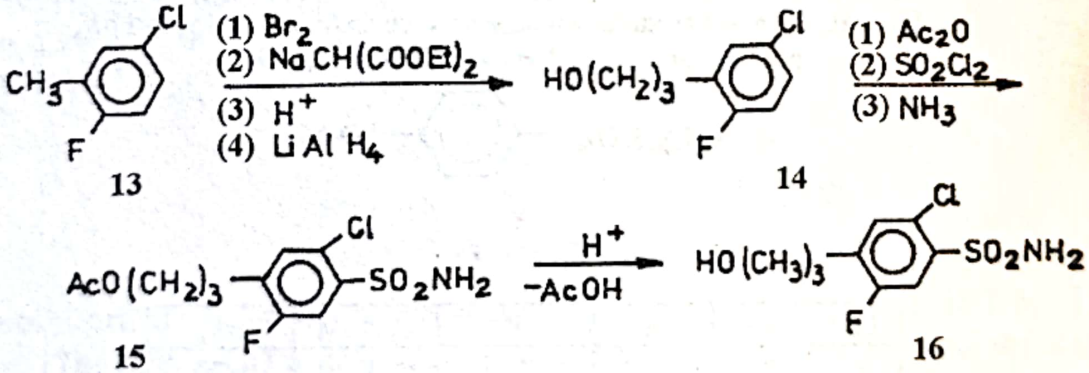
12	*n*	*m*	Y	IC_{50} (*n*M)	pK_a
a	2	0	H	37	9.27
b	2	2	H	24	9.38
c	3	0	H	20	10.23
d	3	2	H	12	8.98
e	4	0	H	9	10.17
f	4	2	H	7	9.60
g	5	0	H	4.3	9.25
h	3	0	Cl	9	9.45
i	2	0	F	9	9.76
j	2	2	F	5	9.00

Scanned with OKEN Scanner

k	3	0	F	3.5	9.64
l	3	2	F	4.5	9.02
m	4	0	F	1.5	9.82
n	4	2	F	4.0	9.18
o	2	0	NO_2	21	9.42
p	3	0	NO_2	23	9.38
q	3	2	NO_2	–	8.00
r	2	2	COOMe	30	9.20
s	3	0	COOH	10^4	9.94
t	3	2	COOH	900	9.28
u	2	2	NH_2	51	9.50
v	3	2	NH_2	23	9.15

Practic, capacitatea de inhibiție a crescut prin lungirea lanțului alchilic de la $n = 2$ la $n = 5$. De asemenea, aproape fără excepție, sulfonele ($m = 2$) au fost inhibitori mai puternici comparativ cu sulfurile corespunzătoare ($m = 0$). Fenomenul poate fi corelat cu scăderea p*Ka*-ului grupării SO_2NH_2 (tabelul 18) de către substituenții de tipul hidroxialchilsulfonil (în comparație cu substituenții de tipul hidroxialchiltio). Prezența unor atomi de fluor sau clor în poziția 3 a nucleului benzenic, a condus, în general, la IAC mai puternici, pe când grupări precum COOH, COOMe, au generat inhibitori mai slabi. Grupările NO_2 sau NH_2 în aceste poziții au indus obținerea de inhibitori cu eficacitate similară compușilor nesubstituiți.

Derivații 2-cloro-5-fluoro-4-substituiți ai benzensulfonamidei de tipul **15** și **16** au fost sintetizați de Shepard și colab.[189] conform strategiei prezentate în schema 8.

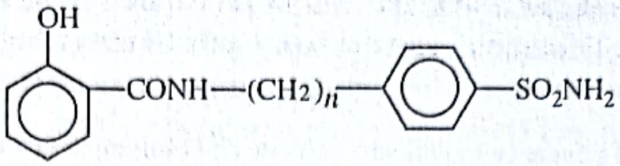


Schema 8

Prin tratarea 3-fluoro-5-clorotoluenului cu brom în condiții homolitice urmată de sinteza cu ester malonic sodat, deprotejare la acidul monocarboxilic corespunzător, urmată de reducerea esterului obținut s-a sintetizat hidroxipropil-derivatul **14**, care a fost acetilat, clorosulfonat și amidat. Sulfonamidele de tipul **15** și **16** obținute în acest fel, posedă valori IC_{50} în jur de 20 nM, fiind inhibitori puternici, similar compușilor **12** discutați anterior [189].

Recent, Boddy și colab.[191] au investigat inhibiția AC eritrocitare cu derivații acidului salicilic **17**.

Scanned with OKEN Scanner

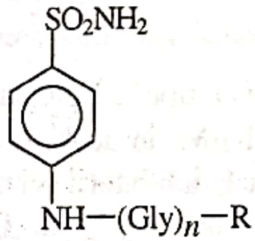


17: **a** : $n = 0$ $K_I = 0{,}053$ μM
b: $n = 1$ $K_I = 0{,}098$ μM

Compuşii **17** au fost preparaţi prin reacţia salicilatului de fenil cu sulfanilamida şi respectiv homosulfanilamida. Aceşti compuşi inhibă AC eritrocitară umană mai puternic decât sulfonamidele de la care derivă, probabil datorită efectului de micşorare al pK_a-ului sulfonamidic, prin substituirea cu grupări arilamido (compusul **17a** are $pK_a = 7{,}72$, iar **17b** are valoarea corespunzătoare de 7,93 – aceste valori se referă la cedarea protonului grupării SO_2NH_2) [191].

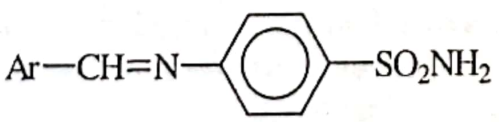
Aceiaşi autori au investigat legarea inhibitorilor de tipul **17** de eritrocite, comparativ cu derivaţii corespunzători posedând grupări SO_2NHMe şi respectiv SO_2NH-2-piridil, care nu au proprietăţi de IAC. Pentru sulfonamidele nesubstituite **17**, s-a constatat o puternică legare de eritrocite, pe când sulfonamidele N-substituite corespunzătoare au afinităţi de 10-100 ori mai mici pentru eritrocite şi de 100-1000 ori mai mici pentru AC [191].

Peptidil-sulfonamide de tipul **18** au fost recent raportate de Christianson [192]. Activitatea inhibitoare a acestei serii de compuşi a crescut odată cu creşterea numărului de resturi glicil din moleculă, iar esterii benzilici au fost mai activi decât cei metilici (de exemplu, IC_{50} pentru compusul **18** cu $n = 3$, R = $PhCH_2$, era de 40 nM) [192].

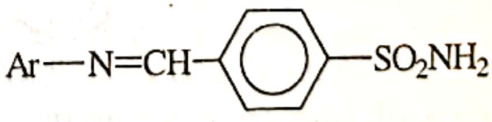


18 $n = 1 - 3$
R = Me, CH_2Ph

O altă procedură utilizată pentru a prepara IAC de tipul sulfonamidelor aromatice implică formarea de baze Schiff. Primii compuşi de acest tip (**19** şi **20**) au fost deja raportaţi de Beasley şi colab. [185] prin condensarea sulfanilamidei cu benzaldehide 4-substituite, respectiv aniline substituite cu 4-sulfamoil-benzaldehida. Compuşii de tip **19** şi **20** au prezentat valori IC_{50} de ordinul a 10^{-7} M [185].



19



20

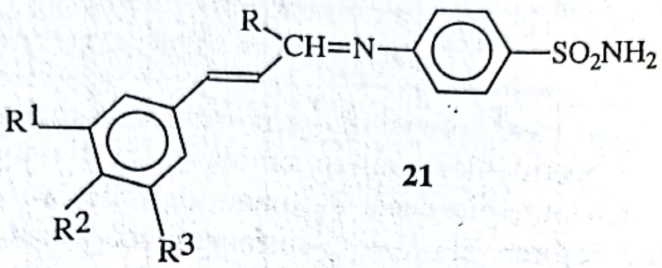
Ar = 2-HO-C_6H_4; C_6H_5–
4-Cl-C_6H_4 etc.

Scanned with OKEN Scanner

Recent, această reacție a fost aplicată la prepararea unor inhibitori ai AC de tipul **21**, prin reacția sulfanilamidei cu chalkone substituite (tabelul 19) [193].

Tabelul 19

Inhibiția AC II bovine cu baze Schiff derivate de la sulfanilamida de tipul **21**



21

21	R	R^1	R^2	R^3	$IC_{50} \times 10^{-7}$ (M)a
a	Me	H	H	H	5.4
b	Me	H	OMe	H	2.1
c	Me	H	NMe_2	H	1.3
d	Me	H	Cl	H	3.8
e	Me	OMe	OMe	OMe	1.5
f	Ph	H	H	H	7.1
g	Ph	H	OMe	H	17
h	Ph	H	NMe_2	H	18
i	Ph	H	Cl	H	12
j	Ph	OMe	OMe	OMe	24
k	4- $MeOC_6H_4$	OMe	OMe	OMe	14
l	4- $H_2NC_6H_4$	OMe	OMe	OMe	10
m	4- Ph-C_6H_4	OMe	OMe	OMe	27

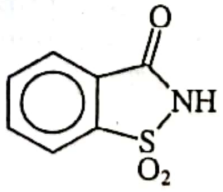
[a] În aceleaşi condiţii de determinare, sulfanilamida are o valoare $IC_{50} = 10^{-6}$ M.

Cu puține excepții, bazele Schiff de tipul **21** preparate sunt inhibitori mai puternici comparativ cu sulfanilamida (IC_{50} = 1 μM, în aceleaşi condiții, față de izozima AC II bovină) [193]. Substituțiile care conduc la inhibitorii cei mai eficace implică:

1) gruparea R (provenită din chalkonă) să fie puțin voluminoasă, metil-derivații fiind inhibitori mai puternici comparativ cu compuşii conținând astfel de resturi voluminoase (fenil, fenili-4-substituiți, bifenil);

2) substituenții care induc creşterea liposolubilității compusului respectiv (metoxi, halogeni) induc o creştere simultană a eficacității compusului ca IAC.

O ultimă remarcă merită a fi făcută relativ la zaharină, **22**.



22 (97 μM)

Deşi acest compus posedă o grupare sulfonamidică modificată, recent, Supuran şi Banciu [194] au demonstrat că zaharina posedă o acțiune de inhibitor

Scanned with OKEN Scanner

slab al AC, având un IC_{50} de 97 μM. Nu este cunoscut până în prezent, dacă această proprietate are importanță fiziologică, la dozele utilizate în mod normal (vezi și secțiunile despre inhibitorii cu grupări sulfonamidice modificate, 5.3. și respectiv 6, despre complecșii zaharinei cu diverși cationi, care posedă proprietatea de a inhiba AC).

5.1.2. *Sulfonamidele heterociclice*

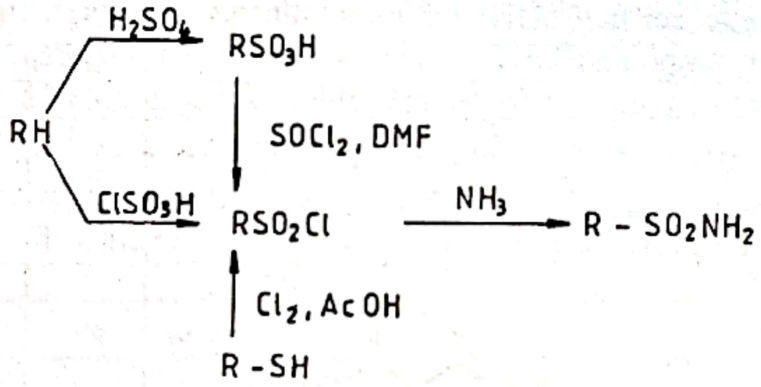
Investigarea sulfonamidelor heterociclice ca IAC a fost impulsionată de descoperirea lui Davenport [195] că tiofen-2-sulfonamida este un inhibitor de 40 ori mai eficace decât sulfanilamida.

În perioada imediat următoare, cercetările lui Roblin [14] au permis prepararea și testarea ca IAC a unui număr important de sulfonamide heterociclice derivate de la sisteme ca: imidazol, alchil- și aril-imidazoli, benzimidazol, benzotiazol, 1,2,4-triazol, tiazol, tetrazol, alchil-/aril-tetrazoli, 1,3,4-tiadiazol, pirimidină, pirazină etc.

Pentru a prepara astfel de derivați, au fost utilizate două strategii [14]:

1) sulfonarea/clorosulfonarea compușilor heterociclici, urmată de amidare;

2) clorinarea oxidativă a mercaptoderivaților heterociclici, urmată de amidare (schema 8A).



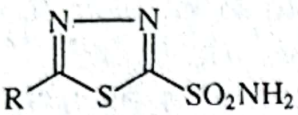
Schema 8A

Cea de-a doua metodă de preparare a fost mai frecvent utilizată deoarece pe de o parte reacția de sulfonare/clorosulfonare nu poate fi aplicată întotdeauna cu succes anumitor compuși heterociclici, iar pe de altă parte, pentru că mercaptanii heterociclici pot fi preparați relativ ușor prin numeroase alte metode [14a]. Din aceștia, clorurile de sulfonil sunt apoi obținute cu randamente mari, iar reacția de amidare decurge, practic, cu randament cantitativ.

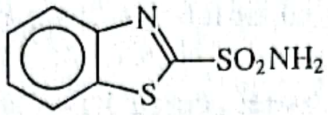
Compușii preparați prin aceste metode de Roblin către grupul lui [14], au permis stabilirea a două corelații importante între structura chimică și activitatea biologică a derivaților respectivi. În primul rând, s-a constatat că substanțele cu ciclu de cinci atomi sunt mai active decât cele cu ciclu de șase atomi. Pe de altă parte, rezultatul testării sulfonamidelor derivate de la heterocicli conținând azot și sulf în moleculă le-a acreditat ca fiind inhibitori mult mai puternici decât compușii care nu îndeplinesc aceste cerințe [14]. Ca inhibitori deosebit de eficace au fost detectați derivații 5-substituiți de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida de tipul **23** (**a**: R = NH_2; **b**: R = NHAc), ca și derivații de benzotiazol-2-sulfonamida (compusul **24**).

Scanned with OKEN Scanner

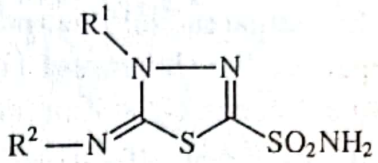
Întrucât compusul **23b**, acetazolamida, posedă proprietăți farmacologice excelente [15] (toxicitate scăzută, acțiune de IAC foarte bună, biodisponibilitate deosebită etc.) a fost introdus în medicina clinică ca primul diuretic non-mercurial. Începând cu 1954, acetazolamida a fost utilizată și în tratamentul glaucomului [11, 13], ulcerelor gastro-duodenale [196], cât și al unei serii de alte afecțiuni (pentru detalii, vezi secțiunile 7 și 8).



23 **a**: R = NH_2
b: R = AcNH



24

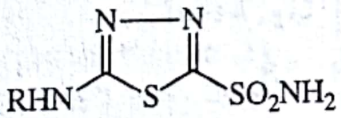


25

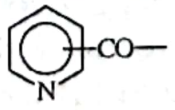
Succesul clinic al acetazolamidei a impulsionat cercetările pentru a identifica structuri noi și mai active din clasa derivaților 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamidei. Astfel, Vaughan și colab. [197a], precum și Young și colab. [197b] au preparat și testat ca IAC sulfonamide de tipul **23**, posedând grupări 5-acilamido-, 5-arilsulfonilamido-, precum și derivați ai 2-sulfonamido-(2-1,3,4-tiadiazolinei, de tipul **25**. Unii dintre cei mai activi inhibitori din aceste clase sunt prezentați în tabelele 20 și 21, împreună cu compuși înrudiți structural, raportați în ultima perioadă de mai multe colective de cercetători [198–200, 202, 203].

Tabelul 20

Inhibiția AC II bovine cu derivați de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (valorile IC_{50} determinate prin micrometoda Maren în condiții SEI)[201]



23

13	R	$IC_{50} \cdot 10^{-8}$ (M)	Ref.
a	H	60	14b
b	Ac	1.2	14b
c	HCO	2.0	197a
d	Me_2CHCO	1.5	197a
e	CF_3CO	4.5	197a
f	PhCO	0.7	197a
g	$PhCH_2OCO$	0.5	197a
h	MeOCO	0.4	185
i	 2-, 3-, 4-substituit	0.6-0.9	198
j	*n*-Pr_2CHCO	0.1	199
k	ciclo-C_4H_7CO	0.8	199
l	1-adamantil-CO	1.1	199
m	$PhSO_2$	0.3	197a

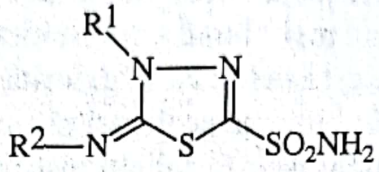
Scanned with OKEN Scanner

n	4-$H_2NC_6H_4SO_2$	0.4	197a
o	CF_3SO_2	0.15	199
p	H_2NCS-	0.70	186
q	H_2NCO-	A	200
r	MeNHCO-	A	200
s	PhNHCO-	A	200

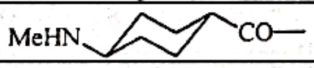
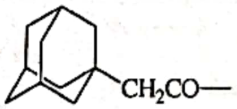
A = inhibitor puternic, dar valoarea IC_{50} nespecificată [200].

Tabelul 21

Inhibiția AC II bovine cu derivați de (2-1,3,4-tiadiazolin-2-sulfonamida (pentru metoda de determinare vezi *Tabelul 20*)



25

15	R^1	R^2	$IC_{50} \times 10^{-8}$ (M)	Ref.
a	Me	H	10	197b
b	Me	Ac	0.9	197b
c	Me	EtCO	A	199
d	Me	$ClCH_2CO$	A	202
e	Me	Cl_2CHCO	A	202
f	Me	Cl_3CCO	A	202
g	Me	FeCCO	A	202
h	Me	PhCO	A	202
i	Me	*n*-Pr_2CHCO	0.6	199
j	Me		0.9	199
k	Me		1.2	199
l	Me	CF_3SO_2	0.1	199
m	Me	3,4,5-$(MeO)_3C_6H_2CO$	4.0	199
n	Me	4-ClC_6H_4CO	5.2	203
o	Me	4-IC_6H_4CO	4.7	203
p	Me	H_2NCS–	1.3	186
r	Et	Ac	A	202
s	Et	EtCO	A	202
t	$PhCH_2$	Ac	A	202

A = inhibitor puternic, cu IC_{50} de ordinul a 10^{-8} M, dar valoarea precisă nespecificată.

Studiul datelor tabelului 20 permite a observa că acilarea aminei **23a** conduce la obținerea unor inhibitori cu eficacitate mărită. Grupările acilamido, cât și cele arilsulfonilamido-/alchilsulfonilamido au un efect similar în acest sens. Puterea inhibitorie asupra izozimei AC II este mult mai mare în cazul compușilor posedând grupări care măresc liposolubilitatea inhibitorului (de exemplu, **23f, g, m, o**). De asemenea, trebuie menționat faptul că derivații având gruparea amino acilată sunt

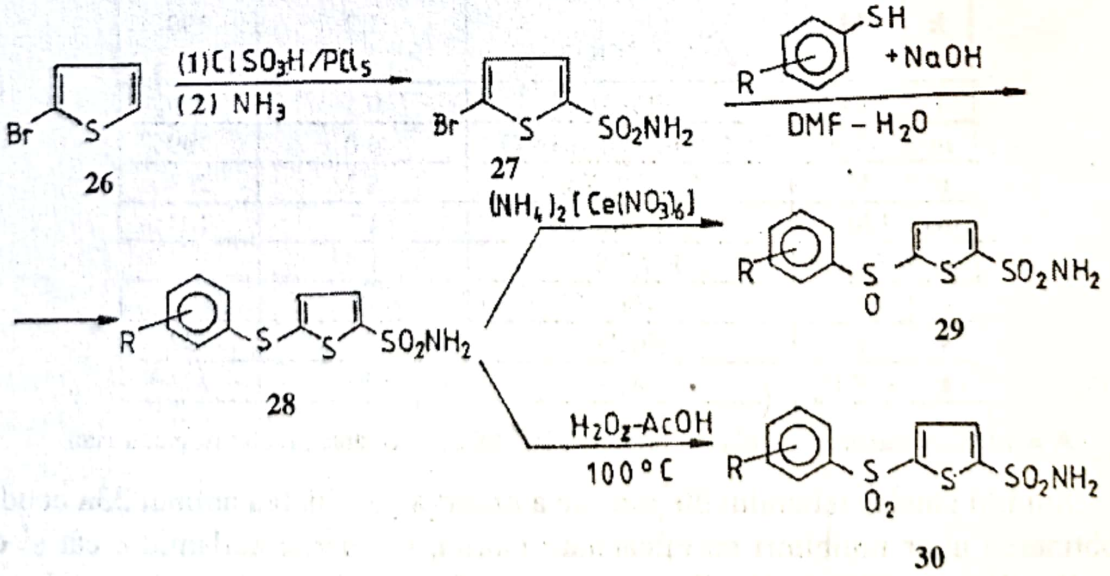
Scanned with OKEN Scanner

acizi mai puternici comparativ cu amina de la care derivă, astfel că anionul sulfonamidat se formează mai uşor în astfel de cazuri. Reamintim, în acest context, că sulfonamidele se leagă în stare ionizată de ionul de Zn(II) din situsul activ al enzimei (secţiunea 4.2.). Din studiul aceloraşi date s-a constatat că derivaţii conţinând grupări (tio)ureido-substituite, de tipul **23p-s** - recent raportaţi [186, 200] – sunt relativ hidrosolubili, dar nu sunt activi pe cale topică în a micşora presiunea intraoculară în glaucom (secţiunea 5.2.1).

Metazolamida (compusul **25b**) raportată deja în 1956 [197b], este utilizată în medicină de peste 40 de ani. Deşi are o structură chimică similară cu a acetazolamidei (**23b**), metazolamida prezintă o serie de particularităţi proprii: liposolubilitatea crescută, prezenţa doar a unui proton acid (la gruparea sulfonamidică), difuzibilitate mai bună în fluidele corporale [16]. Ca şi acetazolamida, metazolamida este netoxică şi datorită profilului său farmacologic specific (secţiunea 7), conferă obţinerea aceloraşi răspunsuri fiziologice dar la doze de 1/3 din cele de acetazolamidă. Aceste calităţi justifică interesul cercetărilor de a investiga un cât mai mare număr de derivaţi de tipul **25** (tabelul 21).

În general, activitatea biologică a acestor compuşi a fost influenţată ca şi pentru compuşii înrudiţi **23**, prin modificări structurale ale grupării din poziţia 5. Prepararea de compuşi în care s-a urmărit substituirea atomului de azot N4 cu grupări variate (deşi marea majoritate a acestor compuşi posedă o grupare N-Me în această poziţie) a condus la descoperirea inhibitorilor topici, cu efect de medicamente antiglaucomatoase [154b] (secţiunea 5.2.1.). Primul inhibitor de acest tip, a fost compusul **25g** - trifluoro-metazolamidă.

Derivaţi de tiofen-2-sulfonamidă de tipul **28-30**, posedând substituenţi 5-ariltio-, 5-arilsulfinil- şi 5-arilsulfonil-, au fost preparaţi cu scopul obţinerii unor agenţi de tip IAC cu efect anticonvulsivant şi vasodilatator cerebral (schema 9) [204].

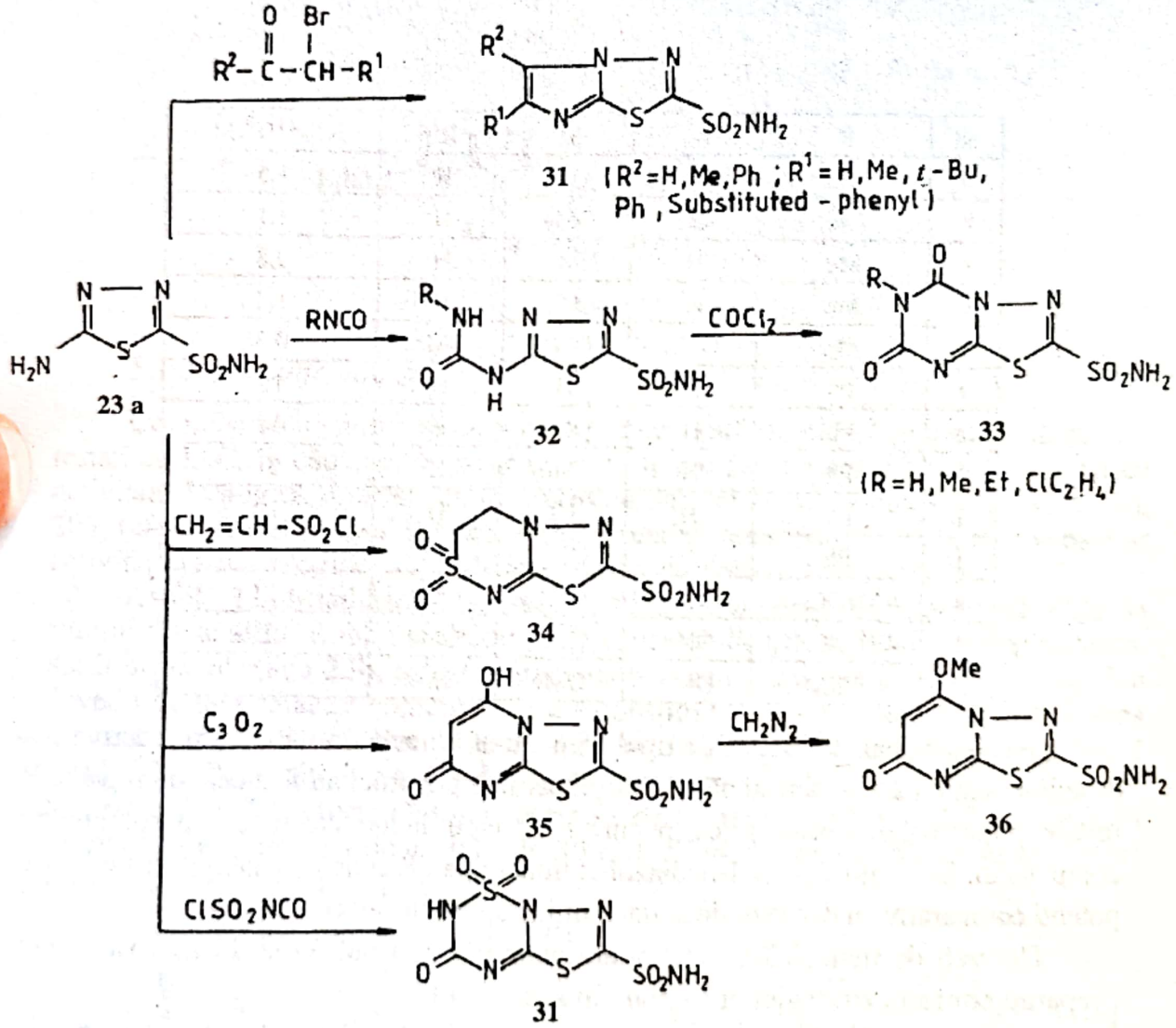


R = H ; 2-Me ; 4-Me ; 4-*t*-Bu ; 3-halogeno
4-halogeno ; 4-OMe ; 4-SMe ; 4-NH_2

Schema 9

2-Bromtiofenul **26** a fost clorosulfonat, iar după amidare 5-bromotiofen-2-sulfonamida a fost tratată cu tiofenoli substituiţi la nucleul benzenic, când printr-o reacţie SN aromatică au rezultat 5-ariltio-tiofen-2-sulfonamidele de tipul **28**. Oxidarea acestora cu diverşi reactivi a condus la sulfoxizii **29**, respectiv la sulfonele **30** [204]. În general, sulfonele **30** au fost mai active în a inhiba izozima AC II comparativ cu sulfoxizii **29**, care la rândul lor au fost mai activi decât sulfurile **28** (valorile IC_{50} au fost în intervalul 10^{-8} - 10^{-9} M) [204].

Alte abordări utilizate în scopul design-ului de inhibitori biciclici, pornindu-se de la 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (**23a**) sau 2-amino-tiazol-5-sulfonamida ca materii prime, au inclus anelarea acestora cu (-bromocetone [205], fosgen [200], suboxid de carbon [200], clorura de etensulfonil [200], izocianat de clorosulfonil [200], după reacţiile prezentate în schema 10.



Schema 10

Imidazo[2,1-b]tiadiazolo-5-sulfonamidele (tipul **31**) precum şi tiadiazolo[3,2-a]pirimidinsulfonamidele (**34-36**) şi tiadiazolo[3,2-a]triazinsulfonamidele (**33, 37**)

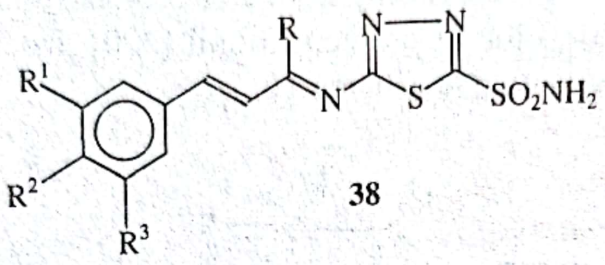
Scanned with OKEN Scanner

obținute prin astfel de reacții s-au dovedit a fi inhibitori eficace, având valori IC_{50} de ordinul a $10^{-8} - 10^{-10}$ M [200, 205].

Utilizând amina **23a** ca materie primă, recent, Supuran şi colab. [206] au raportat baze Schiff de tipul **38**, preparate prin intermediul chalconelor, similare cu derivații **21** ai sulfanilamidei.

Tabelul 22

Inhibiția AC II (bovine) cu baze Schiff derivate de la 2-amino-1,3,4-tiadiazol-5-sulfonamida [206].



38

38	R	R^1	R^2	R^3	$IC_{50}*10^{-8}$(M)
a	Me	H	H	H	1,5
b	Me	H	OMe	H	1,1
c	Me	H	NMe_2	H	0,8
d	Me	H	Cl	H	1,4
e	Me	OMe	OMe	OMe	0,3
f	Ph	H	H	H	18
g	Ph	H	OMe	H	14
h	Ph	H	NMe_2	H	21
i	Ph	H	Cl	H	10
j	Ph	OMe	OMe	OMe	9
k	4-$MeOC_6H_4$	OMe	OMe	OMe	24
l	4-$H_2NC_6H_4$	OMe	OMe	OMe	25
m	4-PhC_6H_4	OMe	OMe	OMe	38

Activitatea bazelor Schiff de tipul **38** a variat în mod similar cu cea a derivaților de sulfanilamidă **21**, în sensul că inhibitorii cei mai puternici au fost cei cu gruparea R relativ puțin voluminoasă şi cu resturi R^{1-3}, care induc creşterea liposolubilității compusului. Derivații de 1,3,4-tiadiazol-sulfonamida **38** sunt însă inhibitori mult mai potenți comparativ cu derivații de sulfanilamidă corespunzători [206].

Derivați de tieno[2,3-b]pirol-5-sulfonamidă, de tipul **43** şi **44** au fost recent preparați conform strategiei prezentate în schema 11.

Anelarea tiofen-3-carbaldehidei cu metiloxicarbonil-metilazida a condus la derivatul de tieno[2,3-b]pirol **40**, care a fost protejat la gruparea NH prin tratare cu benzen-sulfo-clorura. A urmat clorosulfonarea, amidarea şi transformarea grupării carboxi-metil în grupare de amină secundară, conform unei strategii clasice [207].

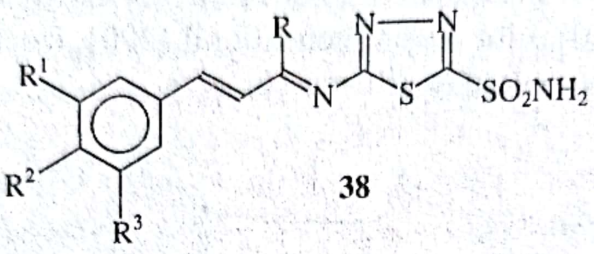
Scanned with OKEN Scanner

obținute prin astfel de reacții s-au dovedit a fi inhibitori eficace, având valori IC_{50} de ordinul a $10^{-8} - 10^{-10}$ M [200, 205].

Utilizând amina **23a** ca materie primă, recent, Supuran și colab. [206] au raportat baze Schiff de tipul **38**, preparate prin intermediul chalconelor, similare cu derivații **21** ai sulfanilamidei.

Tabelul 22

Inhibiția AC II (bovine) cu baze Schiff derivate de la 2-amino-1,3,4-tiadiazol-5-sulfonamida [206].



38

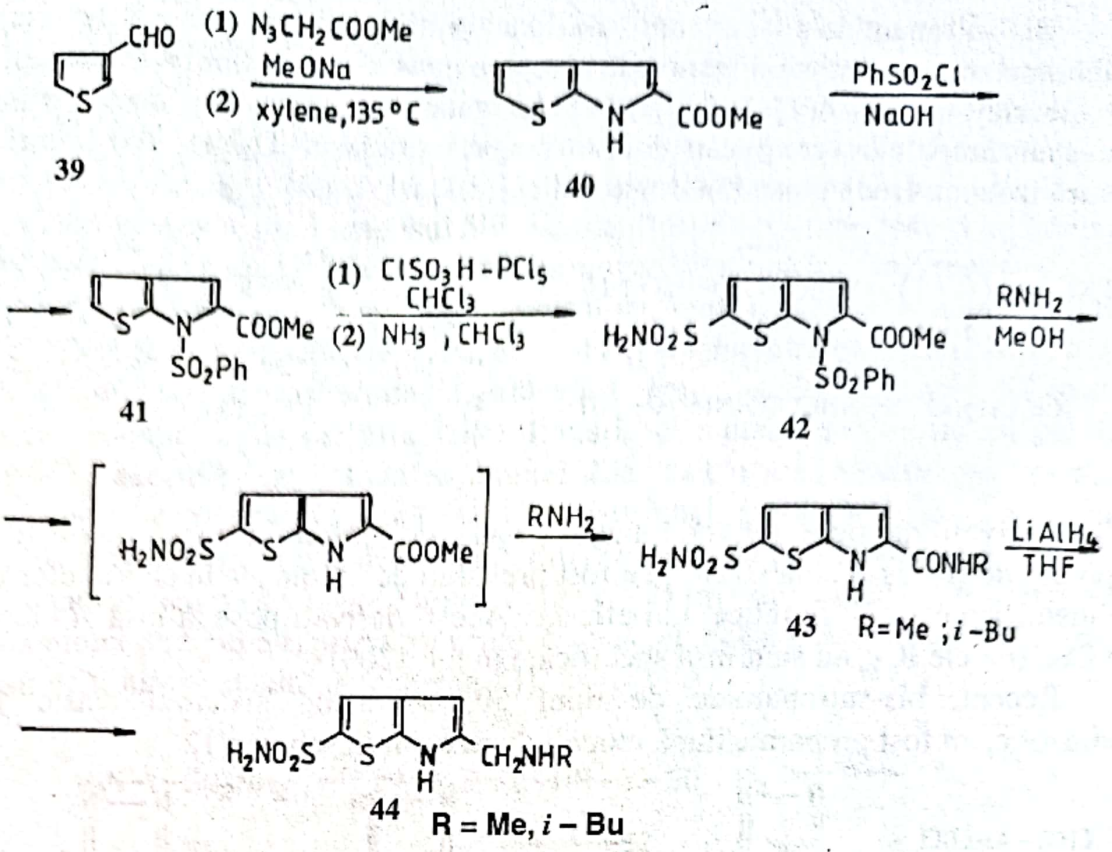
38	R	R^1	R^2	R^3	$IC_{50}*10^{-8}$(M)
a	Me	H	H	H	1,5
b	Me	H	OMe	H	1,1
c	Me	H	NMe_2	H	0,8
d	Me	H	Cl	H	1,4
e	Me	OMe	OMe	OMe	0,3
f	Ph	H	H	H	18
g	Ph	H	OMe	H	14
h	Ph	H	NMe_2	H	21
i	Ph	H	Cl	H	10
j	Ph	OMe	OMe	OMe	9
k	4-$MeOC_6H_4$	OMe	OMe	OMe	24
l	4-$H_2NC_6H_4$	OMe	OMe	OMe	25
m	4-PhC_6H_4	OMe	OMe	OMe	38

Activitatea bazelor Schiff de tipul **38** a variat în mod similar cu cea a derivaților de sulfanilamidă **21**, în sensul că inhibitorii cei mai puternici au fost cei cu gruparea R relativ puțin voluminoasă și cu resturi R^{1-3}, care induc creșterea liposolubilității compusului. Derivații de 1,3,4-tiadiazol-sulfonamida **38** sunt însă inhibitori mult mai potenți comparativ cu derivații de sulfanilamidă corespunzători [206].

Derivați de tieno[2,3-b]pirol-5-sulfonamidă, de tipul **43** și **44** au fost recent preparați conform strategiei prezentate în schema 11.

Anelarea tiofen-3-carbaldehidei cu metiloxicarbonil-metilazida a condus la derivatul de tieno[2,3-b]pirol **40**, care a fost protejat la gruparea NH prin tratare cu benzen-sulfo-clorura. A urmat clorosulfonarea, amidarea și transformarea grupării carboxi-metil în grupare de amină secundară, conform unei strategii clasice [207].

Scanned with OKEN Scanner

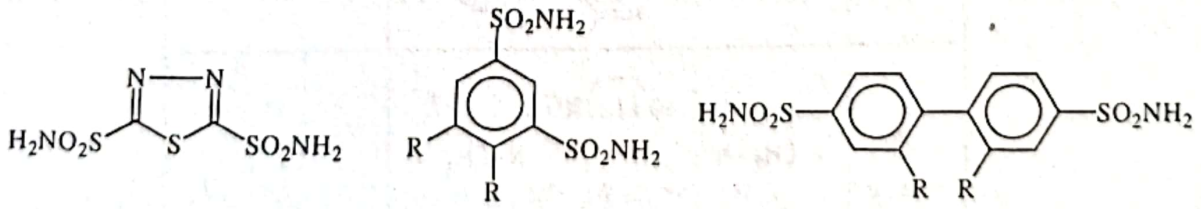


Schema 11

5.1.3. *Bis-sulfonamidele*

Compuşi conţinând mai mult de o grupare sulfonamidică în moleculă, au fost testaţi ca IAC, în căutarea de structuri mai active sau pentru a obţine compuşi cu activitate biologică diferită, ca de exemplu saluretice sau diuretice de ansă [16, 208] (când efectul de inhibiţie al anhidrazei carbonice devine un fenomen subsidiar activităţii farmacologice primordiale a acestor compuşi).

Astfel, 1,3,4-tiadiazol-2,5-disulfonamida (compusul **45**) raportată deja în studiul clasic al lui Roblin şi Clapp [14]) considerată a fi un inhibitor mai puternic decât acetazolamida **23b**, a fost reinvestigată recent de Supuran et al. [207a]. S-a dovedit de fapt că acest compus – care a constituit molecula *lead* pentru obţinerea salureticelor şi a diureticelor de ansă – este un IAC deosebit de slab (*KI* în jur de 1 (M) [207a]. Pe de altă parte, 1,3-disulfamoil-benzenii de tipul **46** sunt, IAC potenţi, care posedă însă şi efecte cloruretice renale de tip tiazidic [208]. Diclorofenamida (compusul **46b**) are o valoare IC_{50} de 30 nM, fiind utilizată clinic ca medicament diuretic şi antihipertensiv [16, 208].

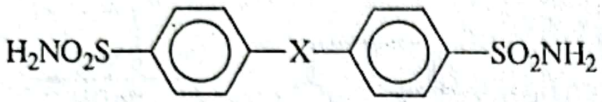


45

46 a: R = H
b: R = Cl

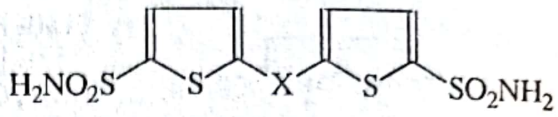
47 a: R = H
b: R = NH_2

Bis-sulfonamidele derivate de la bifenil, bifenileter, bifenilsulfură, bifenilmetan sau conținând resturi de uree sau guanidină, de tipul **47**, **48**, raportate de Beasley și colab. [185] au fost în general mai active decât compușii corespunzători, care conțineau doar o singură grupare SO_2NH_2 (cu valori IC_{50} pentru izozima crudă umană în domeniul 1-7(10^{-7} M) [185].



X = CH_2; O ; S ; NHCONHNH—C(=NH)—NH

48

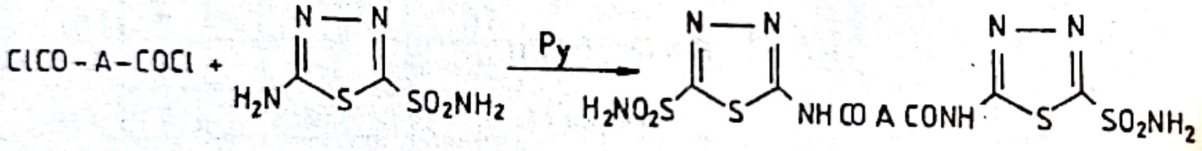


X = CO; CH_2

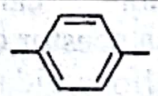
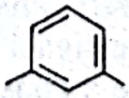
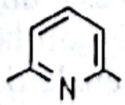
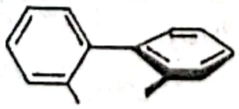
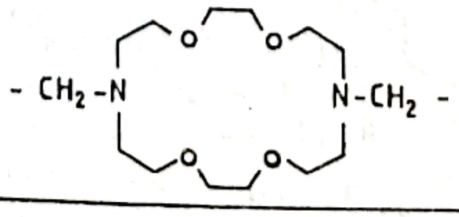
49

Derivați de tipul **49**, conținând resturi de tiofen în locul celor fenilen, raportați de Buzaş şi colab. [209] au fost preparați de asemenea în cadrul eforturilor de identificare a noi diuretice mai eficace. Aceşti derivați posedă însă şi efecte de tip IAC (datele IC_{50} nu sunt însă specificate în ref. [209]).

Recent, bis-sulfonamide de tipul **50**, conținând sistemul clasic 1,3,4-tiadiazolic, au fost preparate după modelul prezentat în schema 12.



23a **50**

50	A	$IC_{50} \cdot 10^7$ (M)
a	$-(CH_2)_4-$	1.70
b		0.95
c		0.60
d		0.80
e		180
f		460

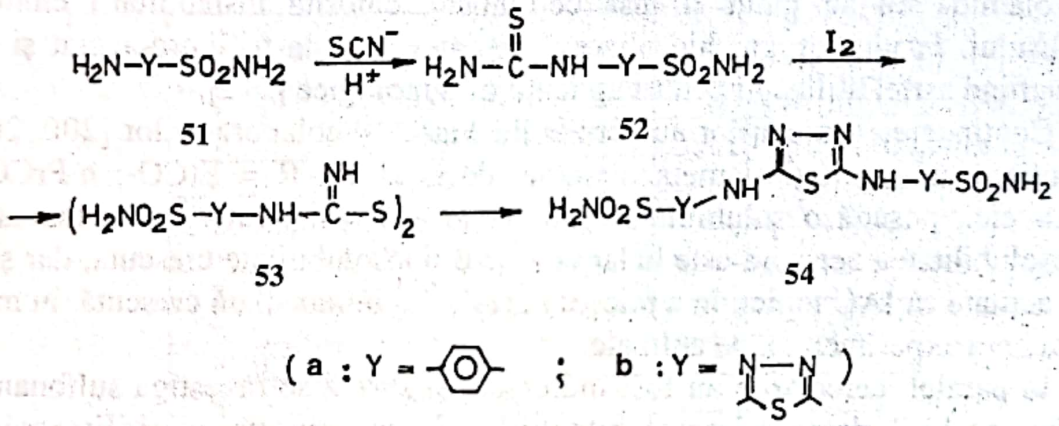
Schema 12

Scanned with OKEN Scanner

Prin tratarea 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamidei (compusul **23b**) cu bis-cloruri acide, s-au obținut bis-amidele, de tipul **50**. Compușii care conțineau grupări de spațiere alifatice, aromatice sau heterociclice nu prea voluminoase între cele două inele tiadiazolice, s-au dovedit a fi IAC eficace. Spre deosebire de aceștia, compușii conținând grupări de spațiere voluminoase (ca difenil, sau diamina macrociclică din compusul **50f**) au manifestat activitate redusă de inhibiție a anhidrazei carbonice. Eficacitatea diminuată a ultimilor doi compuși, este probabil expresia accesului îngreunat în situsul enzimei. Acesta este generat de către grupările deosebit de împiedicate steric, pe care acești inhibitori le conțin [210].

Aplicându-se aceeași strategie pentru a fi preparați derivații acidului oxalic, malonic, succinic, ca și cei ai acizilor fumaric și maleic, aceștia nu au putut fi obținuți. În aceste situații, tratarea aminei **23a** cu clorura acizilor menționați, a condus, printr-o reacție violentă, la formarea unei mase de reacție rășinoasă. Efortul de a izola bisamidele de tipul **50**, din aceasta nu a fost încununat de succes.

Recent, Scozzafava și Supuran [211, 211a] au raportat derivați bis-sulfonamidici de tipul **54**, preparați printr-o nouă sinteză a inelului tiadiazolic, de la derivați de tiouree substituită (schema 13).



Schema 13

Reacția sulfanilidei cu tiocianat și oxidarea subsecventă a 4-tio-ureido-benzensulfonamidei cu iod a fost studiată de Beasley și colab. [185], care însă nu au reușit să determine structura produsului de oxidare. Prin reinvestigarea reacției [211] s-a constatat că se formează un derivat de tiadiazol (**54a**), probabil printr-un intermediar de tip bisulfură (**53**) care nu a fost izolat. Reacția a fost apoi aplicată și pentru obținerea 5-tioureido-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (**51b**). Mecanismul desfășurării reacției este similar celei anterioare, obținându-se ca produs intermediar un tris-tiadiazol-derivat (**54b**). Bis-sulfonamidele **54** sunt inhibitori eficace ai AC II (bovine), cu IC_{50} de 24 nM (**54a**) și resp. 6,4 nM (**54b**) [211].

5.2. Inhibitori selectivi

5.2.1. *Sulfonamide topice utilizate ca agenți antiglaucomatoși*

Deși tratamentul glaucomului cu IAC este foarte eficace în a reduce presiunea intraoculară crescută, [16, 154b] administrarea sistemică a unor

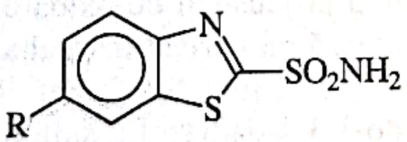
Scanned with OKEN Scanner

medicamente de acest tip (precum acetazolamida **23b** sau diclorofenamida **46b**) conduce la apariţia unor efecte secundare nedorite, datorită inhibiţiei AC din alte ţesuturi, în care enzima este prezentă (rinichi, eritrocite, stomac etc.). Administrarea pe cale topică a unor astfel de medicamente a fost mult investigată, dar în mod constant rezultatele obţinute au fost negative. Din acest motiv, pentru o perioadă îndelungată s-a considerat că IAC pot fi administraţi doar pe cale sistematică [16, 154b]. La începutul anilor '80, eforturile în domeniul cercetării inhibitorilor anhidrazei carbonice au fost orientate de Maren spre obţinerea de compuşi cu o bună hidrosolubilitate (comparativ cu inhibitorii utilizaţi în mod curent în clinică) şi care să posede în acelaşi timp şi o liposolubilitate acceptabilă [212].

Astfel, Maren şi colab. [21] au demonstrat că polihalogeno-acetamida-tiadiazoli, de tipul **23c** şi **25d-g**, posedă astfel de proprietăţi, în sensul creşterii liposolubilităţii drogului, balansată de o reducere a pK_a-ului sulfonamidei şi de mărirea hidrosolubilităţii. Astfel, tifluoro-metazolamida **25g**, un inhibitor puternic al AC, având o valoare scăzută a pK_a-ului (de 6,6) reduce presiunea intraoculară la iepure, prin aplicare în fundurile de sac conjunctivale a unei suspensii apoase 3% [212]. Rezultatele entuziaste obţinute în faza de cercetare pe animale cu trifluoro-metazolamidă nu au putut fi însă continuate, datorită instabilităţii chimice a compusului. *In vivo* drogul hidrolizează în câteva ore la trifluoro-acetat şi imina **25a**, nefiind astfel utilizabil pentru aplicaţii oftalmologice [212].

Continuarea cercetărilor au permis lui Maren şi colaboratorilor [200, 202] să evidenţieze că omologi ai metazolamidei de tipul **25**: R = EtCO-; *n*-PrCO-; *n*-BuCO- etc., posedă o solubilitate crescută în apă comparativ cu metazolamida. Hidrosolubilitatea acestora este balansată de o liposolubilitate crescută, dar şi de o slabă acţiune ca IAC topici, în a micşora presiunea intraoculară crescută, în modele de glaucom experimental, pe animale.

În paralel, cercetările au fost îndreptate şi spre a se investiga sulfonamidele biciclice ca IAC, datorită liposolubilităţii lor, în general, mai mari. Etoxzolamida **55a** (R = OEt), al patrulea medicament devenit clasic ca IAC utilizat în clinică alături de acetazolamidă, metazolamidă sau diclorfenamidă [16], a reprezentat punctul de plecare pentru prepararea de noi derivaţi cu acţiune topică.



55

Astfel, Schoenwald şi colab. [213] au raportat prepararea de benzotiazol-2-sulfonamide substituite în poziţia 6 a nucleului heterociclic de tipul **55** (**b**: R = H; **c**: R = Cl; **d**: R = NH_2; **e**: R = HOC_2H4O-; **f**: R = NO_2; **g**: R = PhCH2O-; **h**: R = AcNH), dezvoltând concomitent un model matematic, care corelează permeabilitatea corneeană a drogului cu structura sa chimică. Studii *in vivo* cu astfel de inhibitori au arătat pentru compusul **55d** existenţa unei slabe acţiuni topice în glaucom [214e], efect neconfirmat însă de rezultatele altor studii [154b, 214b].

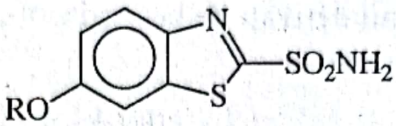
O-Acilderivaţii 6-hidroxi-benzotiazol-2-sulfonamidei (**55i**: R = OH), de tipul **56** au fost preparaţi prin acilarea fenolului **55i** cu anhidride; anhidride mixte (de

Scanned with OKEN Scanner

tipul R-COOCO-NPh_2) sau halogenuri de acil, în piridină sau acetonă [215]. Ultima procedură a condus la un minim de complicaţii (ca de exemplu reacţii de acilare/condensare ale grupării SO_2NH_2) şi a fost aplicată *in extenso*. În tabelul 23 sunt redaţi inhibitorii cei mai activi, preparaţi în baza modelului descris.

Tabelul 23

Date de inhibiţie a AC II (umane) cu derivaţi 6-substituiţi de benzotiazol-2-sulfonamidă [215] (valorile IC_{50} au fost determinate pentru reacţia de hidratare a CO_2 printr-o metodă de tip pH-stat [220]).

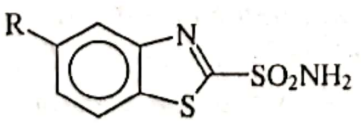


56

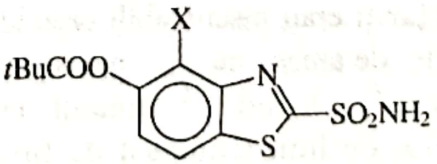
56	R	$IC_{50} \cdot 10^{-9}$ (M)
a	H	4
b	Ac	2
c	*n*-PrCO	3,2
d	*i*-PrCO	6,8
e	*t*-BuCO	4
f	*n*-$C_{11}H_{23}CO$	3,1
g	ciclo-$C_6H_{11}CO$	6
h	PhCO	8
i	$PhCH_2CO$	30
j	4-$Me_2NCH_2C_6H_4CO$	4
k	*trans*-PhCH=CHCO	15
l	$MeOCH_2CO$	3,5
m	$EtO(Me_2)C$-CO	1,2
n	N-Me-pirol-2-CO-	2,9
o	*t*-BuCOCO	10
p	*n*-$BuSO_2$	1,8
q	Me_2NSO_2	1,2
r	Me_2NCO	1,6
s	$(EtO)_2PO$	1,8

Studii *in vitro* şi *in vivo* au demonstrat că esterii de tipul **56**, sunt hidrolizaţi de esterazele prezente în ţesutul ocular, eliberând inhibitorul activ, care este fenolul **55i**. Astfel, aceşti compuşi au acţiune de pre-medicament (*prodrug*) [215]. Mai mult, esterul acidului pivalic, **56e**, posedă proprietăţi de agent hipotensiv ocular în iepuri [154b, 215].

Woltersdorf şi colab. [215] au raportat compuşi cu acţiune inhibitorie comparabilă cu cea a esterilor de tipul **56** amintiţi mai sus nu numai dintre derivaţii 6-substituiţi ai benzotiazol-2-sulfonamidei, ci şi pentru derivaţii 5-substituiţi, de tipul **57**, sau pentru cei conţinând grupări nitro- şi amino-, de tipul **58** [215].



57: R = OH; OMe; *n*Pr-COO



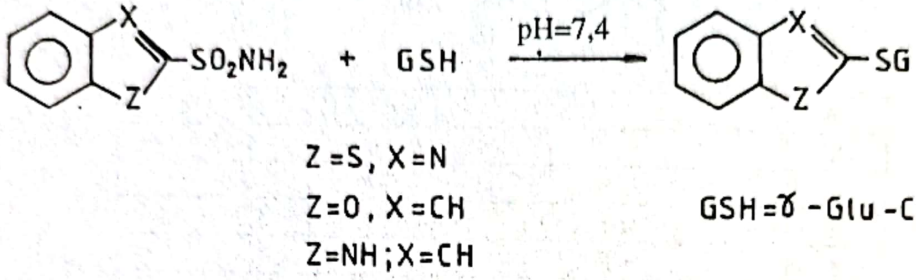
58: X = NO_2; NH_2; NHAc

Deşi posedau proprietăţi de IAC foarte puternice, compuşii de tipul **55-58** nu au putut fi dezvoltaţi pentru utilizări clinice deoarece:

1) *in vivo* erau rapid metabolizaţi, gruparea sulfonamidică suferind o reacţie de substituţie nucleofilă cu glutationul (G-SH, schema 14);

2) generau puternice efecte alergice. Astfel, esterul **56e** de exemplu s-a dovedit a fi un alergen extrem de puternic în studiile realizate pe şobolan [216, 217].

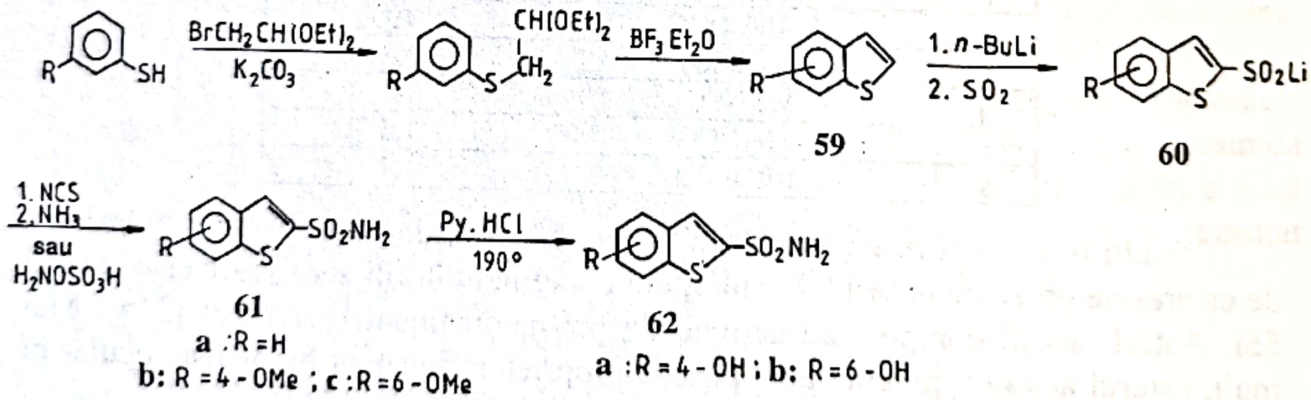
Acţiune alergogenă au manifestat de asemenea sulfonamide biciclice înrudite cu compusul **56e**, precum unii derivaţi de benzotiazol-, [216] benzofuran-, [218] şi indol-sulfonamidă [218].



Schema 14

În scopul evitării unor astfel de efecte nedorite, considerate a se datora caracterului deosebit de electrofil al nucleului benzotiazolic, au fost preparate şi testate ca IAC un număr de sulfonamide derivate de la: benzo[b]tiofen, [217] benzofuran [218] şi indol [218].

Strategia de sinteză a derivaţilor de benzo[b]tiofen-2-sulfonamidă, raportaţi de Graham şi colab. [217], este redată în schema 15.



Schema 15

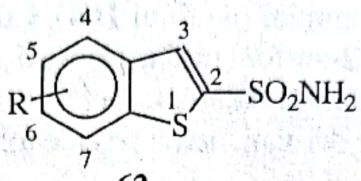
Prin alchilarea tiofenolilor-3-substituiţi cu dietilacetalul bromoacetaldehidei, urmată de ciclizare în prezenţa eteratului trifluorurii de bor, s-au obţinut (R = OMe) amestecuri de 4- şi respectiv 6-metoxi-tiofeni (în raport molar de 1:10). Întrucât compuşii obţinuţi erau inseparabili cromatografic, următoarele etape ale sintezei s-au făcut pe astfel de amestecuri. Acestea au implicat litierea cu *n*-butil-litiu, urmată de tratarea cu SO_2 lichid. Rezultatul etapelor de mai sus a fost prepararea arilsulfinaţilor de litiu (compuşi de tipul **60**). Prin tratarea acestora cu N-cloro-succinimida (NCS), urmată de amidare s-au obţinut sulfonamidele de tipul **61** [217, 219]. Cele două sulfonamide izomere **61b, c** au fost uşor separabile prin cristalizare

Scanned with OKEN Scanner

fracționată din CH_2ClCH_2Cl. Prin demetilarea lor, cu clorhidrat de piridiniu, s-au obținut fenolii **62a,b**, care au fost apoi utilizați la prepararea diverșilor esteri, **62c-h**. Abordându-se aceeași strategie prezentată, s-au obținut și compuși posedând alte grupări în pozițiile 4-, 5-, 6- sau 7- ale inelului heterociclic (tabelul 24) [217].

Tabelul 24

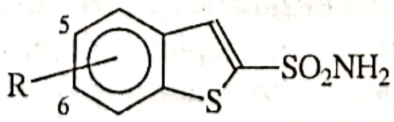
Inhibiția AC II (umane) cu derivați de benzotiofen-2-sulfonamida (metoda de determinare similară cu a inhibitorilor din *tabelul 23* [217, 220]).



62

62	R	$IC_{50}\cdot10^{-9}$ (M)
a	H	5,2
b	6-OH	8,8
c	6-OAc	4,0
d	6-OCO-Bu-t	5,6
e	$6\text{-}OSO_3Na$	6,8
f	$6\text{-}OPO_3Na_2$	100
g	6-OMe	8,8
h	$6\text{-}OCH_2COOH$	14
i	$6\text{-}NH_2$	10
j	6-NHAc	4,8
k	6-Ac	6
l	4-OH	12
m	4-OMe	12
n	5-OH	6,2
o	5-OMe	23
p	$5\text{-}CH_2NMe_2$	12
q	$5\text{-}CH_2SCH_2CH_2NMe_2$	15
r	$5\text{-}CH_2OH$	9
s	$5\text{-}CH_2OAc$	10
t	7-OH	11
u	7-OMe	50

Obținerea acestor compuși, s-a dovedit, a fi un succes deoarece manifestau o activitate de inhibiție a anhidrazei carbonice bună și erau lipsiți de efecte alergene. Din aceste considerente unii compuși, ca de exemplu fenolul **62b**, sau acetatul **62c** au fost selectați în studii preliminare pe animale, ca potențiale medicamente anti-glaucomatoase [217].



62 **a**: X = O
b: X = NH

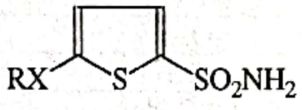
Scanned with OKEN Scanner

Compușii de tipul **63**, ca și derivații benzofuran și indol-2-sulfonamida de tipul **63a, b**, preparați de Graham și colab. [247] printr-o strategie similară, deși s-au dovedit a fi IAC deosebiți de eficace (cu valori de IC_{50} oscilând în jurul valorilor de 8-30 nM), în administrarea pe cale topică, similar cu congenarii etoxozolamidei, s-au dovedit a fi alergeni puternici.

Similar derivaților de hidroxialchiltio- și hidroxialchilsulfonil-benzensulfonamida (de tipul **11, 12**; secțiunea 5.1.1), Shepard și colab. [189] au raportat sinteza de inhibitori ai anhidrazei carbonice derivați de 5-hidroxi-alchiltio- și 5-hidroxi-alchilsulfonil-tiofen-2-sulfonamida, (de tipul **164**). Compușii sus-menționați au fost preparați din 5-bromotiofen-2-sulfonamida, printr-o succesiune de reacții similare celor de la benzensulfonamidele menționate anterior (schema 7 – secțiunea 5.1.1). Valorile IC_{50} și pK_a ale acestor derivați, activi pe cale topică, sunt redate în tabelul 25.

Tabelul 25

Valori IC_{50} și pK_a pentru derivați de hidroxialchiltio- și hidroxialchilsulfonil-tiofen-2-sulfonamida 64 [189] (enzima utilizată este AC II umană, determinările enzimatice de tip pH-stat).



64

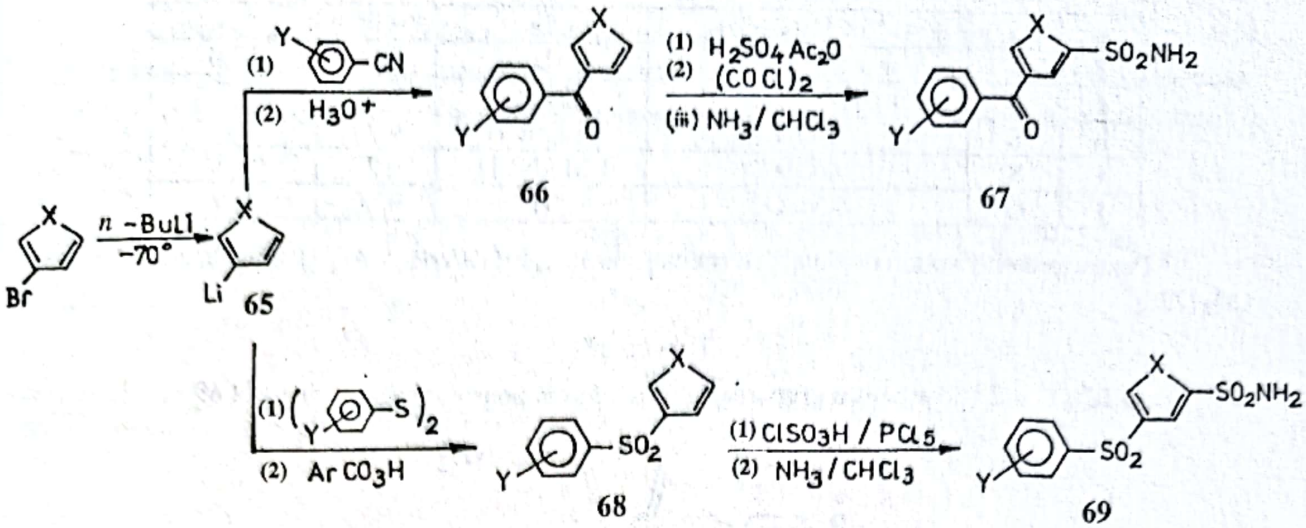
64	R	X	pK_a[a]	IC_{50}[b] (nM)
a	$HO(CH_2)_2$	S	9,46	30
b	$HO(CH_2)_2$	SO_2	8,65	6
c	$AcO(CH_2)_2$	SO_2	8,65	5,5
d	$HO(CH_2)_3$	S	9,32	10
e	$HO(CH_2)_3$	SO_2	8,32	6
f	$AcO(CH_2)_3$	SO_2	8,05	5
g	$MeOCH_2COO(CH_2)_3$	SO_2	8,10	4,5
h	*i*-$BuOCOO(CH_2)_3$	SO_2	9,50	[c]
i	$HO(CH_2)_4$	S	8,67	3
j	$HO(CH_2)_4$	SO_2	9,30	2,3
k	*i*-$BuNH(CH_2)_3$	SO_2	8,05	18

[a] În 30% EtOH/apă. [b] Pentru hidratarea dioxidului de carbon, catalizată de AC II umană; [c] Compusul hidrolizează parțial și valoarea exactă IC_{50} nu a fost determinată [189].

Activitatea IAC pentru compuși de tipul **64** este influențată în același mod, ca pentru sulfonamidele aromatice corespunzătoare, de tipul **11** și **12**, adică de natura grupărilor din poziția 5 a inelului heterociclic. Astfel, sulfonele sunt în general mai active decât sulfurile corespunzătoare, iar activitatea de inhibiție este crescută prin mărirea restului hidroxialchil de la doi la patru atomi de carbon. Mai mult, hidroxialchil derivații sunt inhibitori mai puternici decât amina secundară **64k**.

Buna activitate inhibitorie enzimatică a derivaților de tiofen-2-sulfonamida 5-substituiți, care, administrați pe cale topică, micșorau presiunea intraoculară, în modelele animale de glaucom experimental [189], a condus la investigarea unor sisteme înrudite: derivații 4-substituiți ai tiofen-2-sulfonamidei și respectiv cei ai furan-2-sulfonamidei, de tipul **67** și **69** [220]. Aceste sulfonamide au fost preparate după succesiunea de reacții prezentată în schema 16:

Scanned with OKEN Scanner



Schema 16

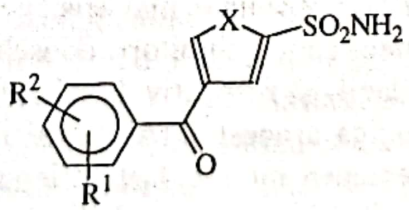
Intermediarul cheie în aceste sinteze a fost litio-heterociclul **65** (X = S, O), preparat din 3-bromotiofen/furan şi *n*-butil-litiu [221]. Prin tratarea compusului intermediar cu benzonitrili substituiţi, s-au obţinut, după hidroliza acidă, 3-aroil-heterociclii de tipul **66**. Aceştia nu au putut fi clorosulfonaţi întrucât prin tratarea lor cu acid clorosulfonic se obţineau răşini, din care nu puteau fi izolate sulfoclorurile corespunzătoare [221]. Sulfonarea în condiţii blânde (acid sulfuric concentrat – anhidridă acetică, la temperatura camerei), urmată de tratarea cu clorură de oxalil, a condus la obţinerea sulfoclorurilor respective. Acestea prin amidare cu amoniac în cloroform, au permis prepararea 4-aroil-tiofen/furan-2-sulfonamidelor de tipul **67** [220, 221a].

În mod similar, tratarea litio-derivaţilor **65** cu disulfuri de aril, urmată de oxidarea cu acid *m*-cloroperbenzoic, a permis sinteza sulfonelor de tipul **68**. Ulterior acestea au putut fi clorosulfonate, obţinându-se cu randamente mari 4-arilsulfonil-tiofen/furan-2-sulfonamidele **69** [220, 221b].

Datele din tabelele 26 şi 27, redau activitatea IAC şi valorile pK_a ale unor sulfonamide preparate conform reacţiilor de mai sus.

Tabelul 26

Date IC_{50} şi pK_a pentru sulfonamide de tipul 67 [220].



67

64	X	R^1	R^2	pK_a [a]	IC_{50} [b] (nM)
a	S	4-MeO	H	8,20	3,2
b	S	4-OH	H	7,90	2,5
c	S	4-Me	H	9,30	2,0
d	S	4-MeNHCH$_2$	H	9,57	4,5

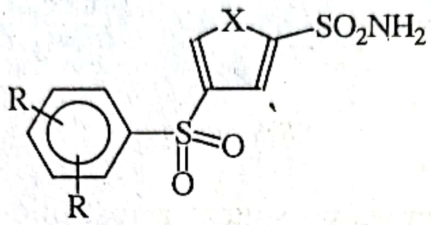
Scanned with OKEN Scanner

e	S	4-$PhCH_2NHCH_2$	H	9,35	2,4
f	S	4-*n*-$BuNHCH_2$	H	9,32	12,0
g	S	4-[$O(CH_2CH_2)_2NCH_2$-]	H	9,28	3,7
h	S	4-OH	3-Et_2NCH_2	9,22	7,0
i	S	4-OH	3-Me_2NCH_2	9,28	6,4
j	O	4-MeO	H	9,50	2,0

[a] Pentru protonii sulfonamidici, determinate în 30% EtOH/apă. [b] AC II umană, la hidratarea CO_2 [220].

Tabelul 27

Date IC_{50} şi pK_a (doar pentru gruparea sulfonamidică) pentru inhibitori de tipul **69** [220].



69

69	X	R^1	R^2	pK_a [a]	IC_{50} [b] (nM)
a	S	4-MeO	H	8,78	45
b	S	4-OH	H	7,46	5,0
c	S	4-Me	H	8,95	3,2
d	S	4[$O(CH_2CH_2)_2NCH_2$-]	H	8,84	7,6
e	S	4-*n*-$BuNHCH_2$	H	9,35	29
f	S	3-OH	H	9,35	2,1
g	S	4-*i*-$BuNHCH_2$	H	9,10	12
h	S	2-*i*-$BuNHCH_2$	H	8,98	18
i	S	4-*t*-$BuNHCH_2$	H	9,30	36
j	S	4-OH	3-Et_2NCH_2	8,75	9,0
k	S	4-OH	3-Me_2NCH_2	8,95	9,0
l	S	3-OH	4-Et_2NCH_2	8,98	16
m	O	4-OMe	H	8,32	2,5
n	O	4-OH	H	8,50	4,2
o	O	4-Me	H	8,02	4,2
p	O	4-OH	3-Me_2NCH_2	8,12	7,0
q	O	4-OH	3-Et_2NCH_2	8,72	10.0

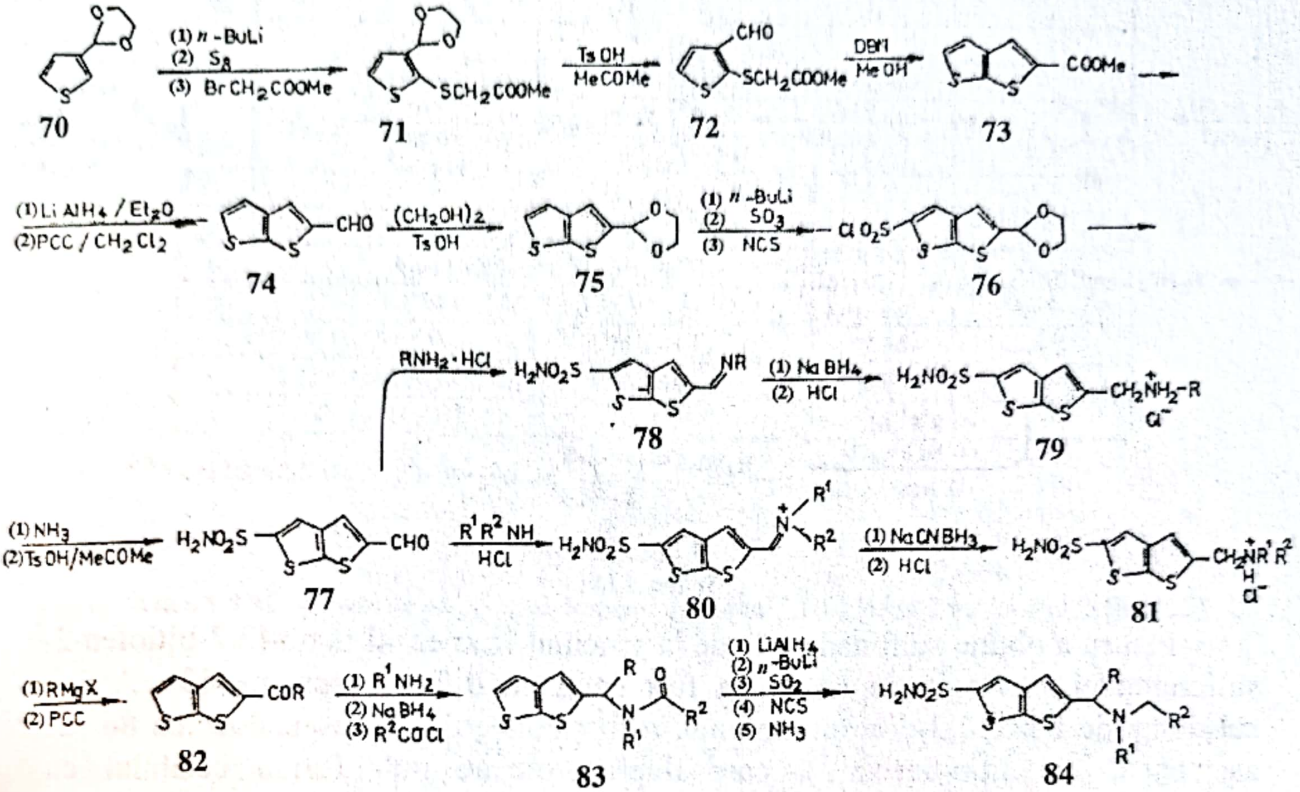
[a, b] Vezi tabelul 26.

Compararea rezultatelor prezentate mai sus, permite a susţine că derivaţii acestor sisteme heterociclice sunt inhibitori deosebit de eficace, în timp ce substituenţii resturilor 4-arilacil- şi respectiv 4-arilsulfonil nu influenţează în mod substanţial activitatea biologică a acestor IAC. Mai mult, aceşti compuşi posedă capacitatea de a reduce presiunea intraoculară la iepure, în modelele de glaucom experimental, fără a manifesta acţiune alergenă, prezentă la alţi derivaţi sulfonamidici deja discutaţi [220].

Succesul unor inhibitori din clasele menţionate, caracterizaţi prin valori IC_{50} în domeniul nanomolar şi eficienţa în administrarea topică, a condus la noi investigaţii în domeniul sulfonamidelor biciclice. Au fost astfel abordate sistemele anelate, având ca reprezentant tipic tiofenul.

Scanned with OKEN Scanner

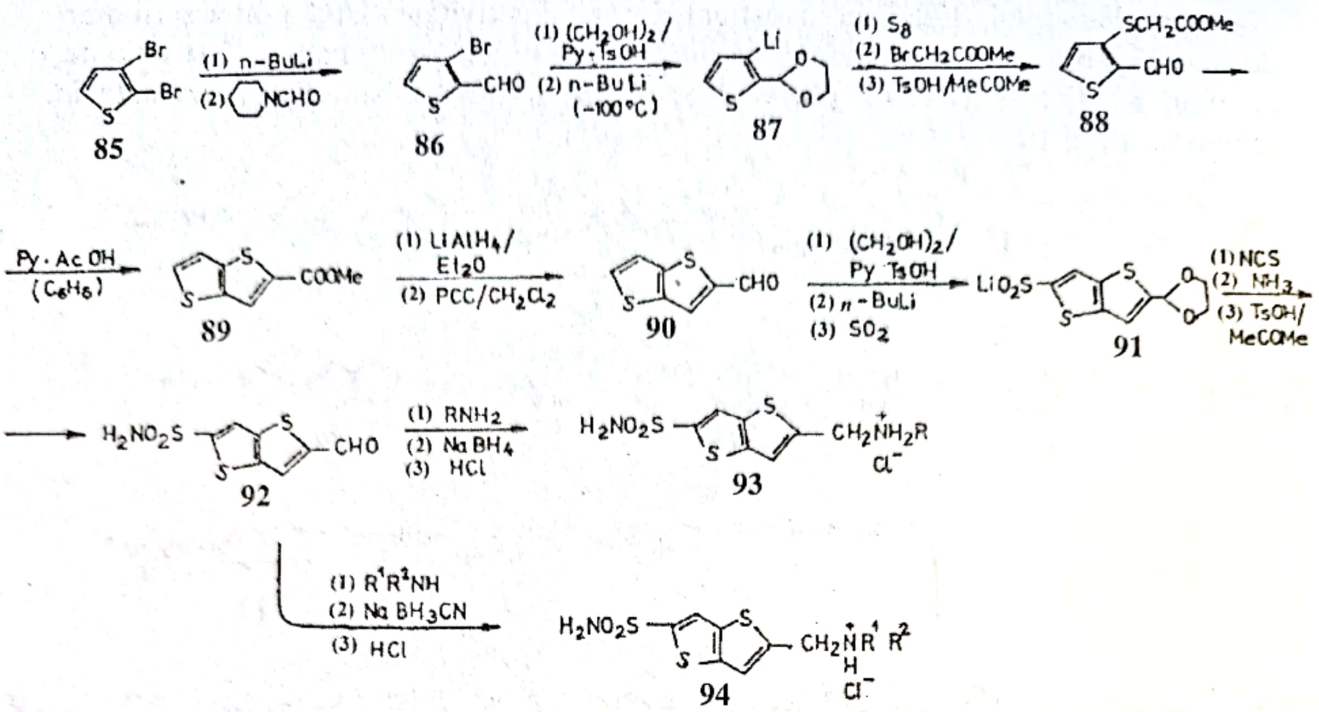
Prugh şi colab. [222] au investigat sinteza şi activitatea IAC a unor serii mari de tieno[2,3-b]tiofen-2-sulfonamide şi tieno[3,2-b]-tiofen-2-sulfonamide-5-substituite, de tipul **81** şi respectiv **94**, obţinute conform strategiilor sintetice prezentate în schemele 17 şi 18.



Schema 17

Pentru anelarea primului sistem biciclic s-a pornit de la cetalul tiofen-3-carbaldehidei, care a fost litiat. Compusul organometalic obţinut a fost apoi tratat cu sulf elementar, iar mercaptanul rezultat alchilat cu bromoacetat de metil. Deprotejarea grupării aldehidice din compusul **71** s-a realizat printr-o reacţie de transcetalizare, cu acetonă în prezenţa acidului 4-toluen-sulfonic (TsOH). După sinteza derivatului **72** s-a realizat ciclizarea lui în prezenţa 1,5-diaza-biciclo[4.3.0] non-5-enei (DBN), în metanol [222]. Esterul **73** a fost apoi convertit la aldehida **74**, prin reducere cu alanat de litiu, urmată de oxidare cu clorocromat de piridiniu (PCC) în clorura de metilen. Pentru introducerea grupării sulfonamidice, a fost necesară reprotejarea grupării aldehidice, sub forma cetalului cu etilenglicolul. Cetalul **75** a fost apoi litiat, tratat cu dioxid de sulf lichid, iar clorosulfinatul de litiu oxidat cu N-clorosuccinimida (NCS) la sulfoclorură. Sulfoclorura **76** a fost amidată şi deprotejată la gruparea aldehidică, rezultând intermediarul cheie **77**. Gruparea aldehidică din poziţia 5 a fost ulterior convertită (*via* baze Schiff de tipul **78-80**) la grupări de amină secundară/terţiară, în scopul obţinerii de compuşi de tip sare, prin tratare cu acizi minerali. Astfel de compuşi (**79, 81**) posedă hidrosolubilitate relativ bună [222]. În altă variantă a acestor sinteze, pentru a obţine compuşi cu substituţii diferite în poziţia 5, s-au preparat din aldehida **74**, cetone de tipul **82** (prin intermediul derivaţilor organo-magnezieni), care au fost apoi transformate în sulfonamidele de tipul 84 prin metode similare de la sinteza derivaţilor **79** şi **81**.

Scanned with OKEN Scanner

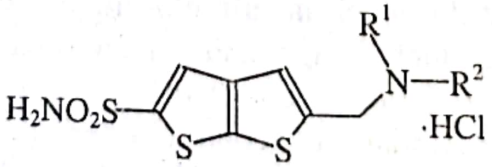


Schema 18

Pentru a obține sulfonamidele de la sistemul izomer, al tieno-[3,2-b]tiofen-2-sulfonamidei, strategia de sinteză a fost oarecum diferită (schema 18). Astfel, substanța de bază, 2,3-dibromotiofenul, a fost convertită la monoaldehida **86** (de asemenea, *via* litio-derivații), care după protejare sub forma cetalului cu etilenglicolul a fost în continuare litiată în poziția 3. Pentru introducerea grupării metiloxicarbonil-metiltio-, s-a abordat o strategie asemănătoare celei din schema 17. În aceste sinteze anelarea intermediarului **88** s-a realizat mai ușor comparativ cu cele de la prepararea izomerului său (**73**), în prezența acetatului de piridiniu (Py·AcOH). Introducerea grupării sulfonamidice a respectat etapele similare celor sistemului izomer al tieno-[2,3-b]tiofenolului. Aldehida **92** a fost apoi transformată în aminele secundare/terțiare **93** și **94**, prin intermediul bazelor Schiff, care au fost reduse cu borohidrura sau cianoborohidrura (schema 18) [222]. Activitatea inhibitorie asupra anhidrazei carbonice a acestor derivați este prezentată în tabelele 28 și 29.

Tabelul 28

Activitatea IAC și valorile pK_a ale sulfonamidelor derivate de la tieno[2,3-b]tiofen-2-sulfonamida **81** [222].



81

81	R^1	R^2	pK_a [a]	IC_{50} [b] (nM)
a	H	Me	8,02	3
b	H	*t*-Bu	8,28	10
c	H	*i*-PrCH$_2$	7,90	2,5

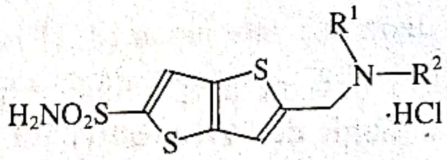
Scanned with OKEN Scanner

d	H	$(CH_2)_4OH$	7,70	3
e	H	$(CH_2)_2OH$	7,18	6,3
f	H	CH_2CH_2OMe	7,00	5
g	H	$(CH_2)_3OMe$	7,52	4,9
h	H	CH_2CF_3	3,75	2,2
i	H	H	7,30	14
j	H	CH_2CH_2SMe	6,85	4
k	H	CH_2CH_2F	6,40	2,7
l	H	CH_2CH_2SOMe	5,58	8,4
m	H	$CH_2CH_2SO_2Me$	5,20	4,5
n	$-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-$		5,25	3
o	$-CH_2CH_2-S-CH_2CH_2-$		5,05	2,6
p	$-CH_2CH_2-SO-CH_2CH_2-$		4,23	4,0
q	CH_2CH_2OMe	CH_2CH_2OMe	5,34	4,2
r	$(CH_2)_2O(CH_2)_2OMe$	CH_2CH_2OMe	5,55	2,8
s	CH_2CH_2OH	CH_2CH_2OH	5,50	2,3

[a, b] Vezi tabelul 26.

Tabelul 29

Activitatea IAC şi valorile pK_a pentru derivaţii de tieno[3,2-b]tiofen-2-sulfonamida **94** [222].



94

94	R^1	R^2	pK_a [a]	IC_{50} [b] (nM)
a	Me	H	7,65	3,2
b	*i*-$PrCH_2$	H	7,60	2,8
c	CH_2CH_2OMe	H	6,65	2,8
d	CH_2CH_2OMe	CH_2CH_2OMe	5,48	2,5

[a, b] Vezi tabelul 26.

Din datele tabelelor 28 şi 29 reiese că ambele sisteme biciclice izomere au condus la sinteza de IAC deosebit de puternici, atât pentru derivaţii de tip amină secundară, cât şi pentru cei de tip amină terţiară. Un compus promiţător sub aspect terapeutic la om pare a fi **81r**, care:

a) este un inhibitor foarte eficace;

b) prezintă hidrosolubilitate în concentraţii de ordinul 2%;

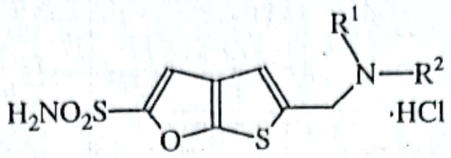
c) este activ în a reduce presiunea intraoculară mărită, în modelele animale de glaucom experimental [222]. Compusul nu a fost însă dezvoltat pentru aplicaţii clinice oftalmologice.

Pornind de la cetalul cu etilenglicolul al furan-3-carbaldehidei, printr-o strategie sintetică identică, Hartman şi colab. [223] au preparat derivaţii similari de tieno[2,3-b]furan-2-sulfonamidă, substituiţi în poziţia 5 cu grupări amino secundare/terţiare, de tipul **95** (tabelul 30).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 30

Date de inhibiție (IC_{50}) [223] și pK_a pentru derivați de tieno[2,3-b] furan-2-sulfonamida 95 [223].



95

95	R^1	R^2	pK_a [a]	IC_{50} [b] (nM)
a	H	Me	7,85	9,0
b	H	Et	8,05	11,0
c	H	*n*-Pr	7,85	8,0
d	H	*i*-Bu	7,55	6,0
e	H	CH_2CH_2OMe	7,00	11,0
f	CH_2CH_2OMe	CH_2CH_2OMe	5,57	5,1
g	H	$(CH_2)_2OEt$	6,85	8,0
h	H	$(CH_2)_4OH$	7,65	11,0
i	H	$(CH_2)_3OH$	7,25	12,0
j	H	CH_2CH_2F	6,55	12,0
k	H	-CH_2-2-piridil	9,08	8,2
l	-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-		9,20	5,6

[a, b] Vezi tabelul 26.

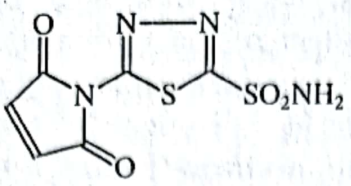
Compușii sintetizați s-au dovedit a fi inhibitori puternici, la concentrații nanomolare realizându-se o inhibiție de 50% a activității specifice a enzimei. Spre deosebire de derivații **81** și **94** discutați anterior, compușii de tipul **95** au manifestat o legare puternică de pigmentul ocular și o reactivitate moderată cu glutationul, având deci acțiune alergogenă [223].

O direcție nouă în sinteza de IAC a fost cea imprimată de dorința de a obține compuși cu acțiune topică de la sistemele heterociclice „clasice" ale IAC, în special derivații de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (**96-99**), tiadiazolilor (**100**) sau derivații 4,5-disubstituiți ai tiofen-2-sulfonamidei (**101**) [224-227].

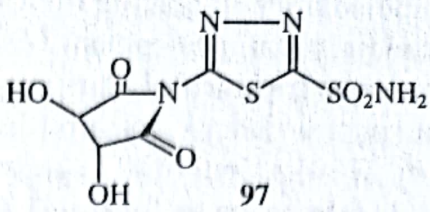
Tratând amina **23a** cu anhidride ciclice nesaturate (ca de exemplu anhidrida maleică), Pierce [224] a obținut imida **96**, care la oxidare cu hidroperoxid de *terț*-butil și OsO_4 a condus la obținerea *trans*-diolului **97**. Prin aplicare locală, sub formă de soluție apoasă, compusul a micșorat presiunea intraoculară la iepuri [224b]. Considerând amina **23a** cu acidul 3-oxoadipic, Pierce a obținut o bază Schiff pe care a redus-o cu $NaBH_3CN$ la amina secundară **98**, care se comportă ca un inhibitor puternic (*in vitro*) al anhidrazei carbonice [224].

Inhibitori de tipul **99**, posedând grupări 5-(-carboxipolimetilen-carboxamida au fost recent raportați de Antonaroli și colab. [225]. Acești compuși posedau valori IC_{50} de ordinul 10^{-7} M. Abordând o strategie similară, Schöenwald și Barfknecht [226], au sintetizat derivatul **100**, prin reacția iminei **24a** cu 1,4-dioxan-2,5-diona, în piridină, la temperatura camerei, timp de 10 zile. Acest compus, ca și derivații trisubstituiți de tiofen de tipul **101**, [227] sunt slab activi pe cale topică, fiind investigați în anumite studii preclinice, experimentale pe animale [224-227]. Acești compuși nu au condus însă la noi medicamente IAC cu aplicații oftalmologice.

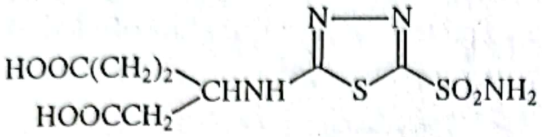
Scanned with OKEN Scanner



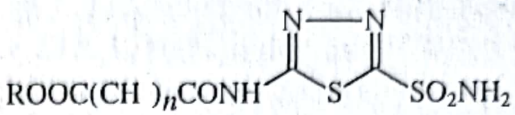
96



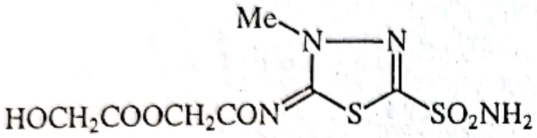
97



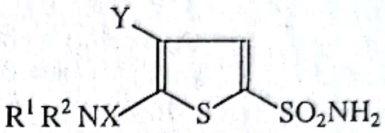
98



99 R = H, Me, Et, *n*-Bu
n = 2-4, 7



100

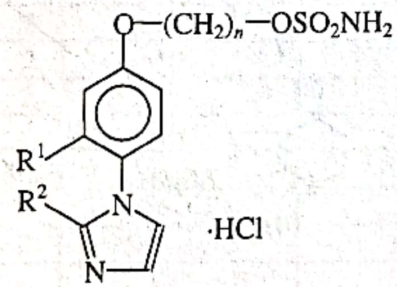


101 X = CO; SO_2
Y = H, halogeno, alchil
$R^1 R^2$ = H, alchil, aril

Recent grupul lui Maren [228] a raportat sulfamați de tipul **102** activi ca inhibitori ai anhidrazei carbonice cu efect topic (tabelul 31).

Tabelul 31

Date de inhibiție (K_I) față de izozima AC II umană, cu sulfamați de tipul **102** [228].



102

102	*n*	R^1	R^2	pK_a[a]
a	2	H	H	0,7
b	2	H	Me	5
c	3	H	H	5
d	2	Cl	H	0,4
e	3	H	Me	3

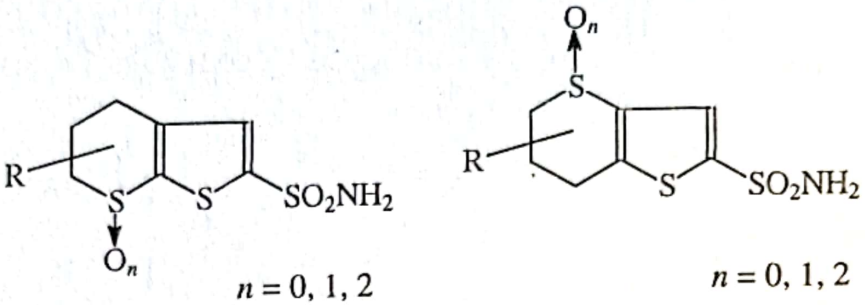
[a] Vezi tabelul 26.

Compușii de tipul **102** pot fi considerați inhibitori cu gruparea sulfonamidică modificată (secțiunea 5.3) și se pot constitui într-o clasă nouă de IAC deosebit de eficace.

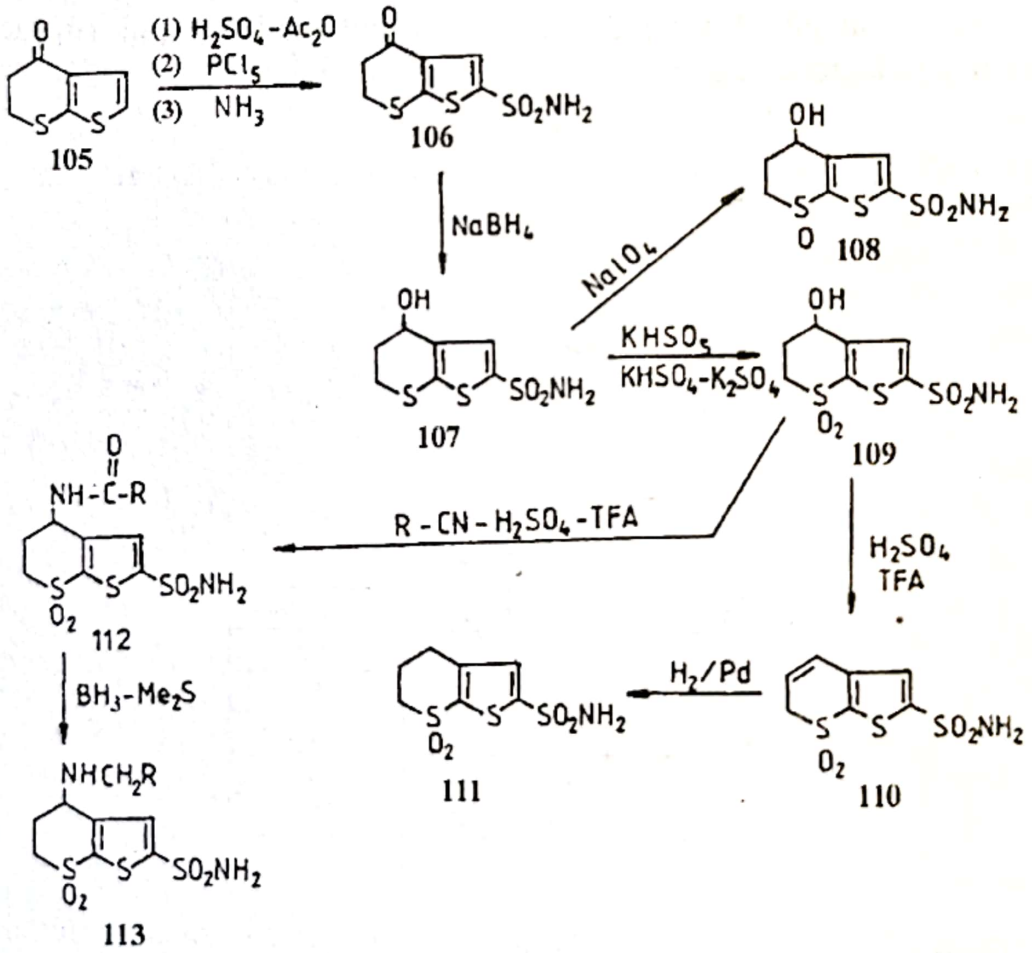
Apogeul cercetărilor în domeniul IAC cu acțiune topică antiglaucomatoasă a fost atinsă prin raportarea de către Ponticello și colab. [229] de tieno-tiopiran-2-

Scanned with OKEN Scanner

sulfonamide solubile în apă, de tipul **103** şi **104**. Compuşii de acest tip sunt unicii care au condus la un medicament IAC cu activitate topică, cu importante aplicaţii oftalmologice în tratamentul glaucomului, fiind un succes farmacologic şi financiar important pentru Merck, Sharp & Dohme, în laboratoarele căreia au fost descoperiţi [230]. Unul dintre aceşti derivaţi ai tieno-tiopiran-2-sulfonamidei, dorzolamida este prima sulfonamidă activă topic cu aplicaţii clinice ca medicament anti-glaucomatos.



Două tipuri de sulfonamide au fost preparate de către grupul de la Merck, Sharp & Dohme, tieno[2,3-b]tiopiran-2-sulfonamidele (tipul **103**) şi respectiv tieno[2,3-b]tiopiran-2-sulfonamidele (tipul **104**).



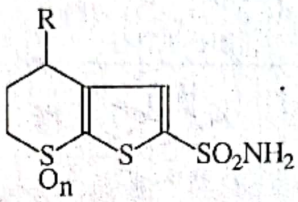
Schema 19

În schema 19 este prezentată sinteza unor derivaţi din prima clasă de sulfonamide, pornind de la intermediarul cheie, cetona **105**, raportată în 1968 de

Degani şi colab. [231]. Prin tratarea compusului **105** cu H_2SO_4-Ac_2O, urmată de transformarea acidului sulfonic în sulfoclorură şi amidare, s-a obţinut sulfonamida **106**. Reducerea acesteia cu borohidrura a furnizat alcoolul **107**, a cărui inel tiopiranic a fost oxidat cu diverşi agenţi, la sulfoxidul şi respectiv sulfona corespunzătoare (**108** şi **109**). Compusul **109** a fost apoi, utilizat pentru a se prepara alchena **110**, precum şi compusul nesubstituit, cap de serie, **111**. Prin reacţie Ritter, sulfona **109** a condus la amide de tipul **112**, care au fost reduse cu ciano-borohidrura la aminele secundare de tipul **113**. Compuşii de tipul **103-113** posedă o solubilitate relativ bună în apă, şi excelente proprietăţi de IAC (tabelul 32).

Tabelul 32

Inhibiţia AC II umane cu derivaţi de tienotiopiran-2-sulfonamida **114** [229, 230] (metoda de determinare enzimatică este cea amintită la *tabelul 23*).



114

114	*n*	R	$IC_{50}\cdot10^{-8}$ (M)
a	0	=O	0,85
b	0	OH	3,0
c	1	OH	10,0
d	2	OH	1,3
e	2	=O	0,5
f	2	H	0,45
g	2	NH_2	0,92
h	2	NHMe	1,40
i	2	NHEt	0,73
j	2	NEt_2	7,0
k	2	NH-*n*-Pr	0,92
l	2	NH-*n*-Bu	1,24
m	2	NH-CH_2-*i*-Pr	0,59
n	2	(R)-64m	0,40
o	2	(S)-64m	5,31

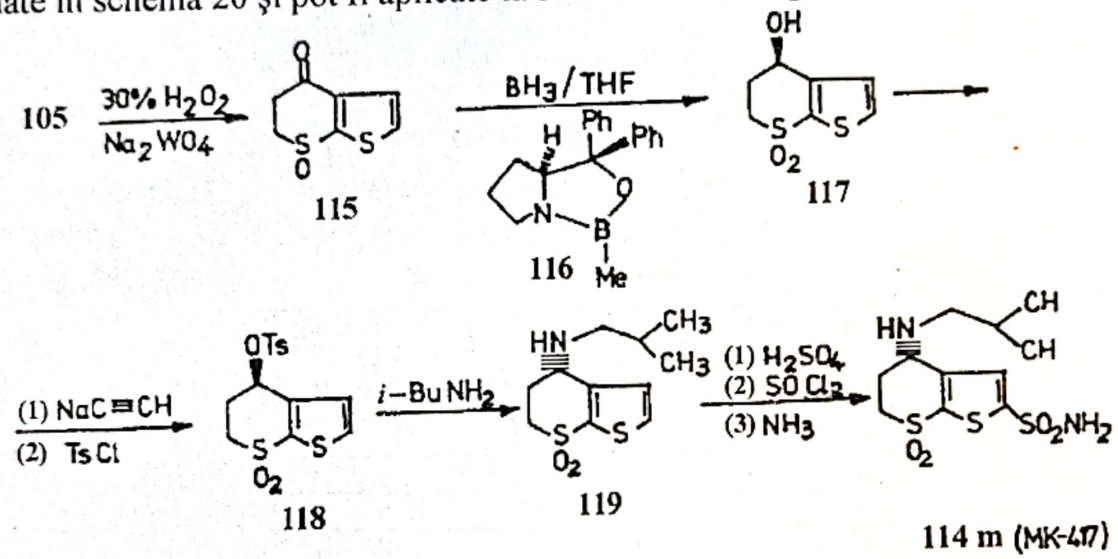
Datele tabelului 32 arată faptul că derivaţii **114** sunt IAC foarte puternici, activitatea lor fiind mult influenţată de gradul de oxidare al atomului de sulf din inelul tiopiranic şi de natura grupării din poziţia 4 a heterociclului. Sulfonele **114** ($n = 2$) au fost cei mai activi IAC. Activităţi deosebite s-au constatat pentru cetona **114e**, derivatul nesubstituit **114f**, amina primară **114g** şi alchil derivaţii **114h-n**. O menţiune deosebită o merită compusul **114m**, posedând sigla MK-927 [229, 230] care a fost iniţial selectat în studii clinice detaliate. Racemicul acestui compus este un IAC, de asemenea eficace (IC_{50} = 5,5 nM). Prin scindarea sa în enantiomeri, s-a constatat, însă, că antipodul (R) - **114n** este un inhibitor de aproximativ 10 ori mai puternic, comparativ cu enantiomerul său, **114o** (tabelul 32) [230]. Prin studii de difracţie a razelor X şi modelare moleculară pe complexul enzimă-inhibitor, s-au

Scanned with OKEN Scanner

evidențiat diferențe în orientarea relativă a celor doi enantiomeri, în situsul activ al izozimei AC II umane, precum și ușoare schimbări conformaționale ale scheletului polipeptidic ca urmare a legării inhibitorilor. De fapt, legarea enantiomerului (R) este favorizată, comparativ cu a enantiomerului (S), datorită interacției nefavorabile a ultimului cu catena laterală a restului His-64 din situsul activ al enzimei [231].

Proprietățile farmacologice deosebite ale acestor IAC, [232] au condus la efectuarea de studii aprofundate asupra acestei clase de sulfonamide, inclusiv la sinteze enantio-selective ale unor reprezentanți ai acestora [233, 234] .

Shinkai [233] a raportat, recent, sinteza enantio-selectivă a izomerului (R)-MK927, denumit MK-417 (**114m**). Etapele mai importante ale acestei sinteze sunt redate în schema 20 și pot fi aplicate la scară industrială [233].



Schema 20

Oxidarea cetonei heterociclice **105** cu peroxid de hidrogen, în prezența wolframatului de sodiu, a condus la obținerea sulfonei **115**, care a fost apoi redusă enantio-selectiv la compusul cheie, alcoolul **117**. S-au încercat diverse reduceri stereospecifice, în prezența:

a) (S)-B-clorodiizopinocamfenilboranului (când raportul (R)/(S) a fost de 12:88);

b) a drojdiei (raportul (R)/(S) fiind de 11/89),

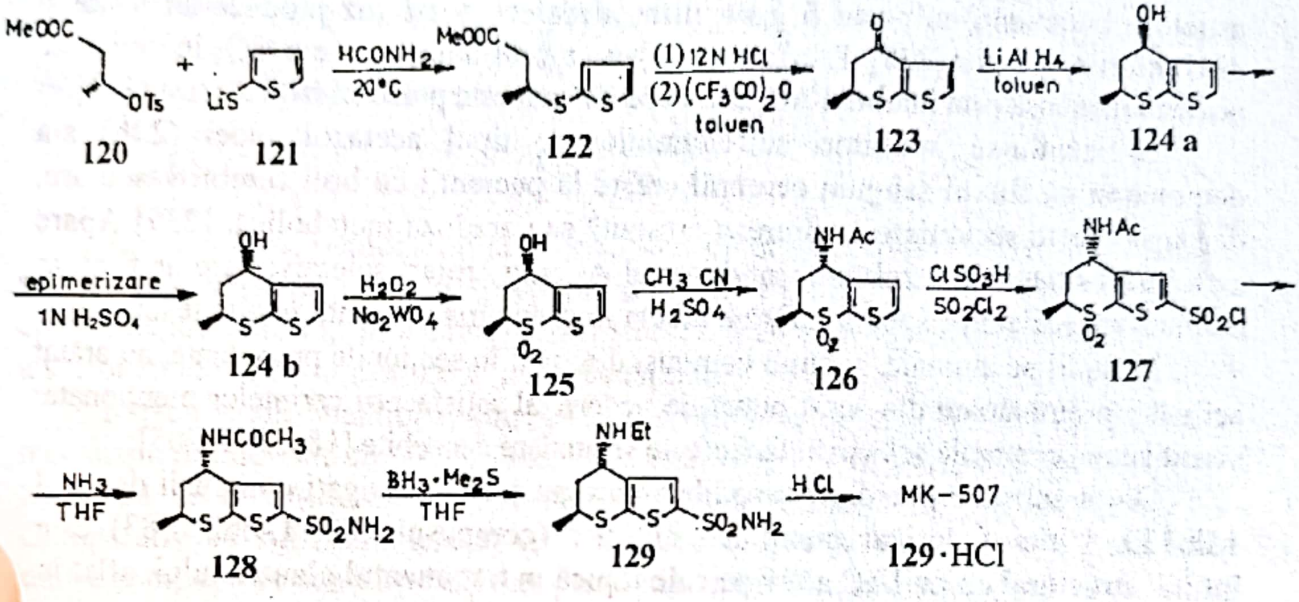
c) a (S)-B-metil-1,3,2-oxazaborolidinei **116** (raportul enantiomerilor a fost (R)/(S) de 9:1.

Pentru sinteza la scară mare, s-a preferat ultimul catalizator de reducere, (**116**), deoarece poate fi preparat ușor din *L*-prolină și conduce la enantiomerul dorit al alcoolului **117**, cu un randament bun [233]. Alcoolul **117** a fost convertit la tosilatul cu aceeași configurație **118**, prin tratare cu clorura de tosil și acetilura de sodiu după care printr-o reacție SN_2 cu *izo*-butilamina s-a obținut derivatul **119**. Reacția ultimă, decurge cu inversia configurației la atomul de carbon 4. Introducerea grupării sulfonamidice s-a realizat, ulterior, prin sulfonare, transformare în clorura de sulfonil, urmată de amidare (reacții care nu au afectat atomul de carbon chiral C-4). Randamentul global de obținere a sulfonamidei MK-

Scanned with OKEN Scanner

417, din acid bromopropionic ca punct de plecare (acidul bromopropionic a fost utilizat la prepararea cetonei 105) a fost de 30%, cu o enantio-selectivitate de peste 95% [233].

Din motive până în prezent puțin explicate, Merck, Sharp & Dohme au ales pentru lansarea clinică compusul MK-507, care este de fapt medicamentul sus-amintit, dorzolamida [235]. Structura acestui compus (**129**) și farmacologia sa, sunt foarte similare cu ale celorlalți derivați de tieno-tiopiransulfonamida amintiți mai sus, dar MK-507 conține doi centri chirali, prin prezența grupării metil din poziția 6. Sinteza sa enantio-selectivă a fost de altfel recent raportată [234] și optimizată pentru aplicarea la scară industrială (schema 21).



120 121 122 123 124 a 124 b 125 126 127 128 129 129·HCl

Schema 21

Sinteza începe de la tosilatul (R)-3-hidroxibutiratului de metil, care prin tratare cu 2-litio-mercapto-tiofen **121** conduce printr-o reacție SN_2 (cu inversia configurației) la obținerea produsului de alchilare **122**. Cursul reacției este diferit, în funcție de solventul utilizat. Solventul utilizat pentru reacție în acest caz a fost formamida. În cazul utilizării altor tipuri de solvenți, eliminarea se produce la crotonatul de metil, care apoi printr-o reacție Michael, conduce la un amestec racemic, de compus **122**. După hidroliza grupării esterice, ciclizarea acestui compus, s-a realizat în prezența anhidridei trifluoro-acetice, în toluen, când s-a obținut cu randament bun cetona **123**. Prin reducerea cetonei **123** cu alanat de litiu în toluen a rezultat cu randament de peste 95% *cis*-alcoolul **124a**, care a fost epimerizat la compusul **124b** în acid sulfuric 1N la rece.

Rezultatul reacțiilor de mai sus a fost obținerea unui amestec 76:24 de alcooli epimeri *trans/cis*-**124**. Amestecul a fost apoi oxidat cu peroxid de hidrogen-wolframat de sodiu, rezultând sulfona **125**. Aceasta, a fost apoi supusă reacției Ritter cu aceto-nitril, în prezența acidului sulfuric. O particularitate observată la desfășurarea acestei reacții Ritter, a fost că ea decurge cu retenția stereochimiei pentru alcoolul de tipul **125**-*trans* și cu o considerabilă inversie a stereochimiei, pentru alcoolul **125**-*cis*, și că în final rezultă doar acetamida **126** cu configurația dorită, *trans* [234]. Acetamida **126** a fost apoi transformată în sulfoclorură și

Scanned with OKEN Scanner

sulfonamidă prin procedeele standard. Reducerea grupării acetamido la gruparea etilamino, cu boran - dimetilsulfură, a generat dorzolamida **129**. Clorhidratul acesteia este MK-507, compusul utilizat clinic [234].

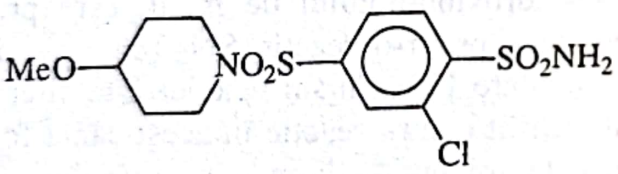
5.2.2. *Vasodilatatori cerebrali selectivi*

În mod clasic, îmbunătățirea funcției cerebrale la persoanele în vârstă se realizează prin administrarea de medicamente vasodilatatoare, ceea ce însă de multe ori are efecte secundare, ca de exemplu scăderea presiunii arteriale [236]. O alternativă ar fi utilizarea dioxidului de carbon ca vasodilatator cerebral specific [237], însă nici un astfel de tratament, nu poate fi generalizat, deoarece acest gaz produce anxietate și discomfort respirator [238]. Efectul de creștere a presiunii parțiale a CO_2 în creier, se poate realiza însă prin inhibiția AC, deoarece enzima este prezentă în acest țesut [16].

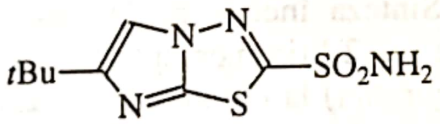
Utilizându-se inhibitori sulfonamidici de tipul acetazolamidei (**23b**) s-a demonstrat că fluxul sanguin cerebral crește la pacienții cu boli cerebrovasculare, dar apar efecte secundare ca diureza crescută sau acidoza metabolică. [239] Apare astfel necesitatea sintezei unui inhibitor al AC din creier, selectiv, care ar fi și un cerebro-vasodilatator specific, fără a afecta însă enzima prezentă în alte țesuturi.

În studii pe animale, anumiți compuși discutați în secțiunile precedente, au arătat activități promițătoare din acest punct de vedere, al satisfacerii cerințelor menționate: vasodilatație cerebrală selectivă, fără efecte secundare deosebite [188, 204, 205].

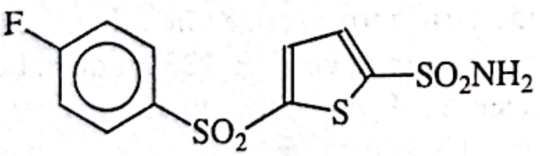
Drept substanțe cerebro-vasodilatatoare au fost investigați compușii de tipul **130-133**. Ultimul derivat menționat anterior (compusul **133**, L-662, 583) este înrudit structural cu un IAC activ pe cale topică în tratamentul glaucomului, aflat în faza cercetărilor pre-clinice [232].



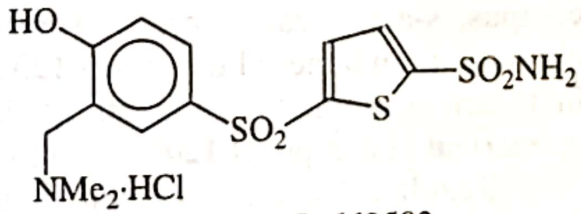
130 (UK - 12130)



131 (UK - 15454)



132 (UK - 17022)



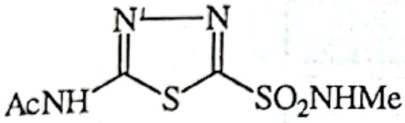
133: L-662583

5.3. Inhibitori cu grupare sulfonamidică modificată

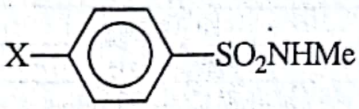
În 1948, Krebs [184] a arătat că toate sufonamidele antibacteriene (posedând grupări de tipul SO_2NHR (unde R = alchil; acil; hetaril etc)) sunt IAC mult mai slabi comparativ cu compușii posedând grupări sulfonamidice intacte,

Scanned with OKEN Scanner

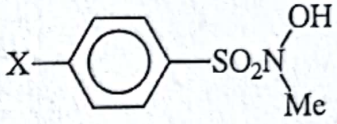
nesubstituite. Ultimele decenii marchează însă reluarea cercetărilor privind investigarea ca inhibitori ai anhidrazei carbonice a compuşilor cu grupări sulfonamidice modificate. Astfel, din necesitatea descoperirii de agenţi antiglaucomatoşi, au fost investigate printre altele *N*-metil-sulfonamidele aromatice şi heterociclice de tipul **134, 135**, ca IAC. Motivaţia cercetării unor astfel de compuşi, constă în constatarea că substituţia pe care o prezintă conferă o liposolubilitate mărită drogului respectiv [240] (secţiunea 5.2.1). Pentru *N*-metil-acetazolamida **134**, care posedă o slabă activitate topică de IAC, s-a demonstrat că aceasta se datorează metabolizării de către anumite enzime din ţesutul ocular la acetazolamidă [240].



134



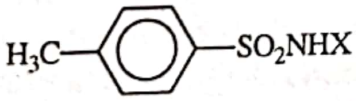
135 **a**: X = NO
b: X = Cl



136 **a**: X = NO_2
b: X = Cl

Alte studii au demonstrat că *N*-metil-sulfonamidele aromatice (135), precum şi *N*-hidroxi-derivaţii lor, **136**, (preparaţi din clorhidratul *N*-metil-hidroxilaminei şi cloruri de arilsulfonil, în piridină) [240] sunt IAC cu o potenţă comparabilă cu cea a sulfonamidelor nesubstituite în a inhiba enzima.

Într-un studiu menţionat anterior la discuţia metodelor RMN în determinarea mecanismului de inhibiţie – secţiunea 4.2., Blackburn şi colab. [167] au preparat şi testat ca IAC, *N*-hidroxi- şi *N*-metoxisulfonamide aromatice, de tipul **137**. Comparativ cu sulfonamidele nesubstituite cu care sunt înrudite structural, unii dintre compuşii de acest tip (**137**) au prezentat valori IC_{50} mai mici.



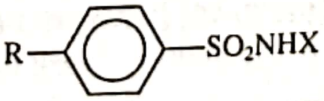
137

Autorii citaţi mai sus au demonstrat prin spectroscopie 111Cd-RMN că aceşti inhibitori se leagă de ionul metalic din situsul activ al enzimei, în stare ionizată, prin intermediul atomului de azot sulfonamidic [167].

Un studiu detaliat al IAC posedând grupări sulfonamidice modificate a fost recent raportat de Supuran şi Banciu [194]. Compuşii de tipul 138 se caracterizează prin faptul că pot poseda o varietate de grupări, ca substituenţi la restul sulfonamidic şi au fost preparaţi din clorura de tosil şi nucleofilul potrivit. Testarea acestor compuşi s-a efectuat comparativ, între ei, asupra izozimei AC II bovine [194] (tabelul 33).

Tabelul 33

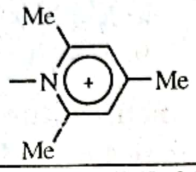
Inhibiţia AC II bovine cu derivaţi posedând grupări sulfonamidice modificate, **138** [194] (inhibiţia determinată prin metoda Maren în condiţii SEI) [201].



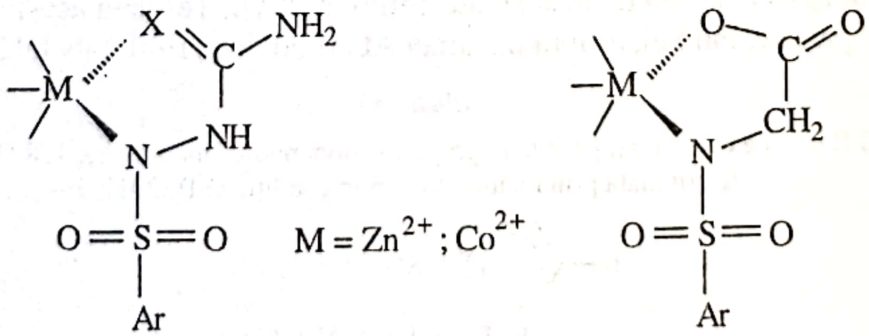
R=F, Cl, Br, AcNH, MeO

138

Scanned with OKEN Scanner

138	X	IC_{50} (μM)
a	H	11
b	OH	9
c	OMe	173
d	OCH_2COOH	13
e	NH_2	53
f	Me	217
g	NMe_2	328
h	NHPh	119
i	$CONH_2$	379
j	$C(NH)NH_2$	>500
k	$NHCONH_2$	462
l	$NHCSNH_2$	411
m	O_2S-C_6H_4-Me-4	>500
n		337
o	CH_2NHSO_2-C_6H_4-Me-4	>500

Explorarea unei astfel de diversități de substituenți (în grupările de tip SO_2NH-X), de la unii compacți ca hidroxi-, alcoxi-, amino-, la alții mai voluminoşi (ureido, tioureido, (tio)semicarbazido etc), până la cei foarte împiedicați steric (tosil, tosilamidometil şi 2,4,6-trimetilpiridiniu), a furnizat posibilitatea de a pune în evidență atât noi clase de IAC, cât şi relații structură chimică-activitate biologică în clasa IAC [194]. Din datele tabelului 33 se observă că activitatea sulfonamidei nesubstituite (**138a**), a *N*-hidroxi- (**138b**), hidrazido-derivatului (**138e**), precum şi a carboxi-metil-oxisulfonamidei, (**138d**) este de acelaşi ordin de mărime în a inhiba izozima AC II. Prezența însă a unor substituenți mai voluminoşi ca de exemplu: metoxi (**138c**); fenilamino (**138h**) etc., conduce la compuşi care au efect nu foarte puternic de inhibiție asupra anhidrazei carbonice, dar oricum cu valori IC_{50} semnificative. Alte sulfonamide *N*-substituite, din această serie – preparate în încercarea de a obține inhibitori bidentați – s-au dovedit a fi inhibitori deosebit de slabi (cu IC_{50} peste 300 μM). O legare ipotetică pentru astfel de inhibitori bidentați este prezentă mai jos, pentru enzima nativă sau substituită cu Co(II).



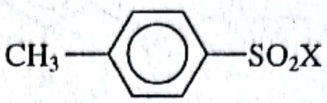
De altfel, se pare că unii dintre compuşii de tipul **138** se pot lega bidentat, cel puțin de Co-AC II (vezi secțiunea 4.2.).

Scanned with OKEN Scanner

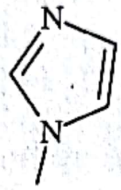
Recent [241] au fost investigaţi compuşi de tipul **139**, care posedă caracteristici structurale comune atât cu sulfonamidele, cât şi cu anionii, principalele două clase de IAC (secţiunile 4.1. şi 4.2.) (tabelul 34).

Tabelul 34

Inhibiţia AC II bovine cu derivaţi amintind atât de sulfonamide, cât şi de anioni anorganici, de tipul **139**. Inhibiţia determinată la fel ca şi pentru compuşii **138** (*tabelul 33*).



139

139	X	IC_{50} (μM)
a		34
b	NO	24
c	NCS	18
d	N_3	45
e[a]	SH	10
f[a]	OH	460

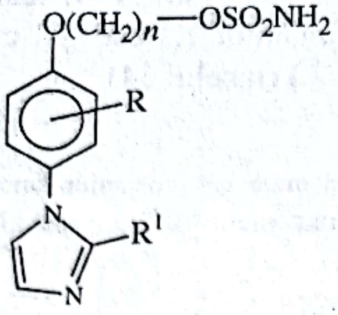
[a] Sub formă de săruri de sodiu.

Aceşti compuşi sunt inhibitori relativ eficace ai izoenzimei AC II, cu excepţia tosilatului **139f** care este un inhibitor extrem de slab. Comparându-se activitatea inhibitorie asupra anhidrazei carbonice a tio-tosilatului (**139e**), în raport cu cea a tosilamidei (**138a**) (tabelul 33) s-a constatat că acesta este practic un IAC, aproape egal, deşi tosilatul **139f** este de 46 de ori mai puţin eficace. În aceste condiţii, se poate postula că tiosulfonaţii heterociclici sunt IAC la fel de eficace ca şi sulfonamidele heterociclice.

Un alt compus care este de asemenea un IAC relativ eficace pentru izozima AC II din tabelul 34 este tosil-imidazolul, **139a**. Modul de legare al acestui inhibitor de enzimă, ca de altfel şi pentru ceilalţi compuşi **139**, nu se cunoaşte actualmente, deşi unii dintre ei au fost investigaţi prin metode spectroscopice asupra Co-AC II [164d]. Rezultatul constatat a fost identificarea unor modificări importante ale spectrului electronic al enzimei în prezenţa acestor inhibitori. Probabil că tiotosilatul se leagă strâns de enzimă, ca anion, prin atomul (ionizat) de sulf. Legarea derivaţilor neutri, **139a-d**, rămâne deocamdată neelucidată [241].

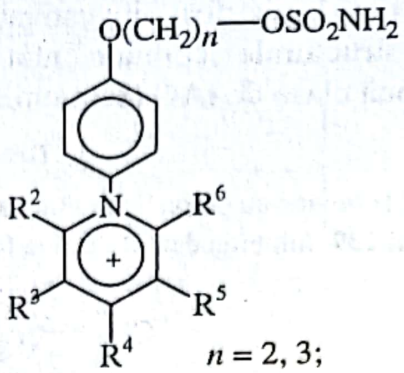
Sulfamaţii de tipul **140**, raportaţi de grupul lui Maren, [228] şi respectiv cei de tipul **141**, preparaţi de Supuran şi colab. [242] pot fi de asemenea consideraţi ca fiind inhibitori cu gruparea sulfonamidică modificată, deoarece spre deosebire de inhibitorii clasici, aceşti compuşi au gruparea SO_2NH_2 legată de un atom de oxigen, şi nu de un rest aromatic/heterolitic.

Scanned with OKEN Scanner



$n = 2, 3;$

140



$n = 2, 3;$

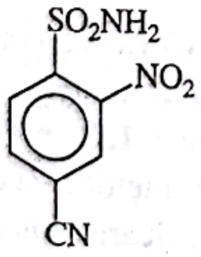
R^{2-6} = alchil, aril.

141

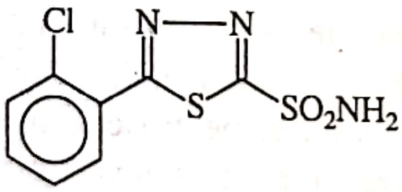
Astfel de compuşi, de tipul sulfamaţilor (**140, 141**), sunt inhibitori eficace, cu valori IC_{50} de ordinul de mărime a $10^{-7} - 10^{-8}$ M [228, 242].

5.4. Inhibitori specifici pentru diversele izozime ale anhidrazei carbonice

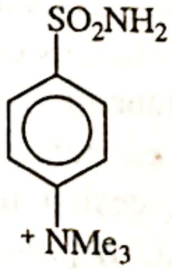
Compuşii care prezintă specificitate ca inhibitori ai anhidrazei carbonice, mai precis pentru diversele izozime sunt relativ puţini. Astfel, 2-nitro-4-cianobenzensulfonamida (**142**) are o afinitate de 40 de ori mai mare pentru izozima AC I a anhidrazei carbonice, comparativ cu cea pentru izozima AC II [243] (deşi, izozima AC II este mult mai susceptibilă la inhibiţia cu sulfonamide, în comparaţie cu izozima AC I). Pe de altă parte, clorazolamida (**143**), sau trifluorometilsulfonamida (secţiunea 4.2) sunt printre puţinele sulfonamide care inhibă în mod substanţial izozima din muşchi, AC III. În fine, pentru izozima asociată membranelor, AC IV, în baza datelor din literatura de specialitate consultată, este cunoscut un singur inhibitor specific, QAS, (**144**) [244].



142



143



144: QAS

Până în prezent, rezultatele cele mai bune au fost obţinute în design-ul de inhibitori specifici pentru izozima AC IV, asociate membranei celulare [245]. Două abordări au fost utilizate în acest scop:

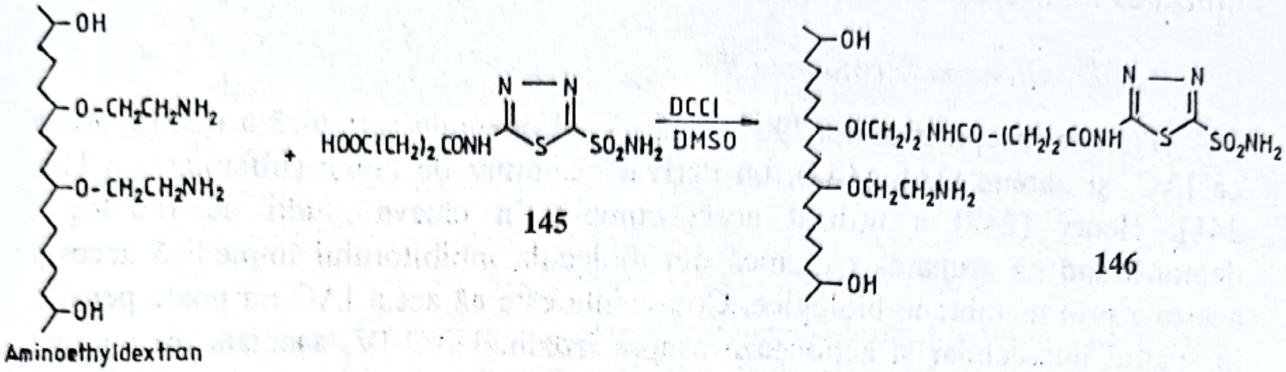
(1) legarea covalentă a sulfonamidelor aromatice/heterociclice de compuşii macromoleculari, şi

(2) ataşarea de grupări cationice la molecula unor IAC de tip clasic.

Scanned with OKEN Scanner

5.4.1. *Inhibitori macromoleculari*

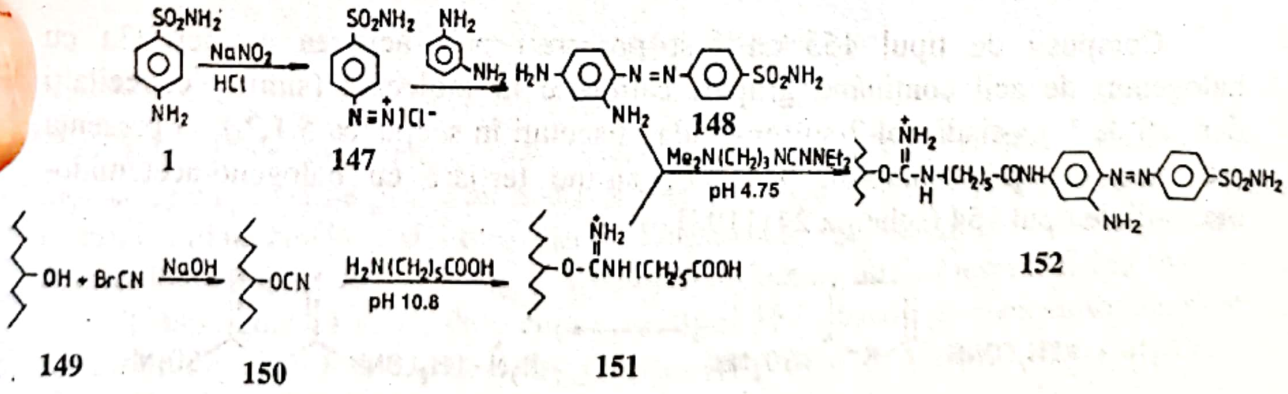
Prima dintre abordările amintite a fost utilizată de Tinker şi colab. [48a] pentru a prepara inhibitori macromoleculari de tipul **146** (schema 22), cu mase moleculare cuprinse între 6,7 - 99 kDa.



Schema 22

Aceşti inhibitori au fost preparaţi prin conjugarea aminoetil-dextranului cu derivatul de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida **145**. Compusul **145** a fost sintetizat din amina **23a** şi anhidrida succinică [48] în prezenţa diciclohexilcarbodiimidei (DCCI), în DMSO. Aproximativ jumătate din grupările aminoetil ale polimerului au fost conjugate, iar valoarea IC_{50} a inhibitorilor de tipul **146** a fost în jur de 0,1 μM [48]. Particular acestor inhibitori macromoleculari este faptul că nu penetrează prin membrana eritrocitară sau a celulelor tubulare renale. Proprietatea menţionată explică inhibiţia selectivă a izozimei luminale (AC IV) precum şi absenţa oricărei acţiuni inhibitorii pe izozimele citozolice (AC I, AC II, AC III) [48b]. Astfel de compuşi nu au putut fi dezvoltaţi ca medicamente, datorită naturii lor macromoleculare (care *in vivo* ar genera răspunsuri imune şi reacţii alergice), dar sunt utilizaţi pentru diverse studii fiziologice şi farmacologice [48].

Un cu totul alt tip de inhibitori macromoleculari a fost raportat de Geers şi colab. [246] (schema 23).



Schema 23

În sinteza lor s-a pornit de la sulfanilamidă, care a fost diazotată şi cuplată cu *m*-fenilen-diamina, obţinându-se colorantul **148**. Acesta a fost apoi tratat cu acid 6-amino-hexanoic legat de dextran (**151**), obţinut prin reacţia aminoacidului cu dextran derivatizat cu bromocianogen (**150**). În prezenta *N*-3-dimetilaminopropil-

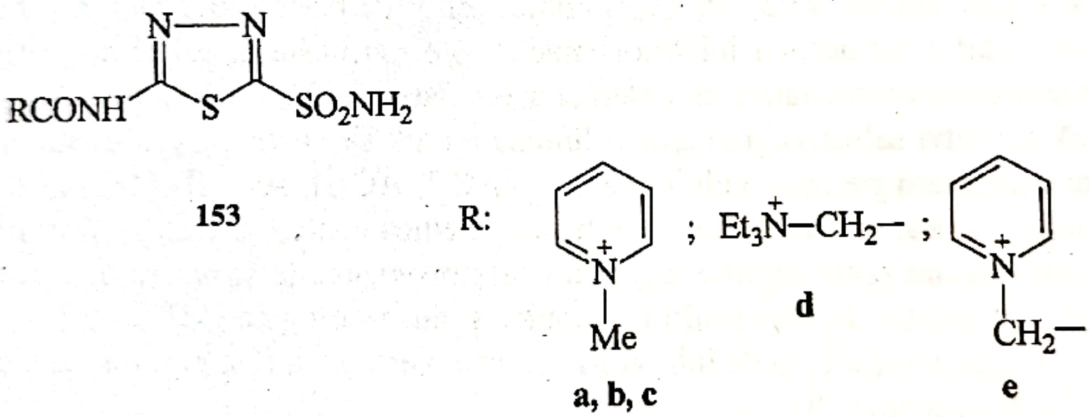
inv. 150951

Scanned with OKEN Scanner

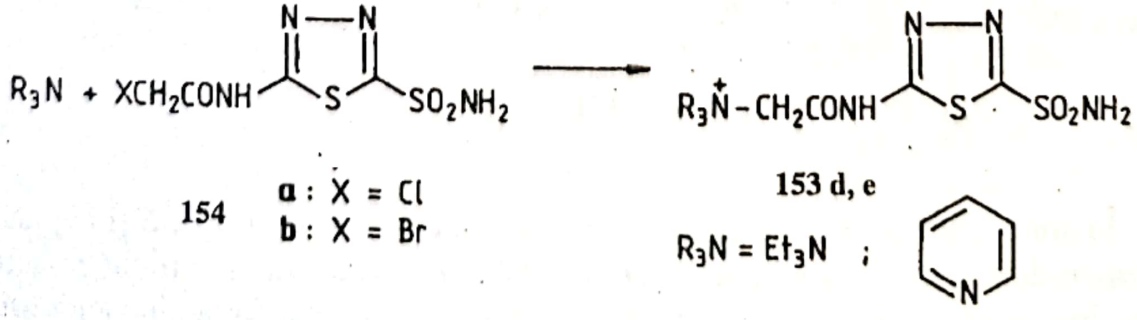
N-etilcarbodiimidei, reacția colorantului **148** cu acidul 6-aminohexanoic legat de dextran, a condus la obținerea inhibitorilor de tipul **152**, care posedă mase molare între 5 și 1000 kDa. Constanta K_I a acestor inhibitori a fost determinată ca fiind în jur de 0.1 – 0.2 μM [246]. Importanța sintezei inhibitorilor de acest tip rezultă din utilizarea lor în studiile fiziologice, pentru studiul izozimelor AC din mușchi [246].

5.4.2. *Sulfonamide cationice*

Până la începutul anilor '90 o singură sulfonamidă cationică a fost raportată ca IAC, și anume QAS (**144**), un derivat cuaternar de homo-sulfanilamidă [16, 244]. Henry [247] a utilizat acest compus în câteva studii de fiziologie, demonstrând că gruparea cationică din molecula inhibitorului împiedică accesul acestuia prin membrane biologice. Consecința este că acest IAC nu poate penetra în spațiul intracelular și acționează asupra izozimei AC IV, asociată membranei plasmatice. Pornind de la aceste date [247] și de la necesitatea de a obține inhibitori potenți specifici ai diverselor izozime ale AC, Supuran și colab. [198] au inițiat studii privind design-ul și sinteza unor compuși de acest tip. Pentru a sintetiza sulfonamide heterociclice/aromatice conținând grupări încărcate cu sarcini pozitive în moleculă, au fost utilizate diverse strategii.

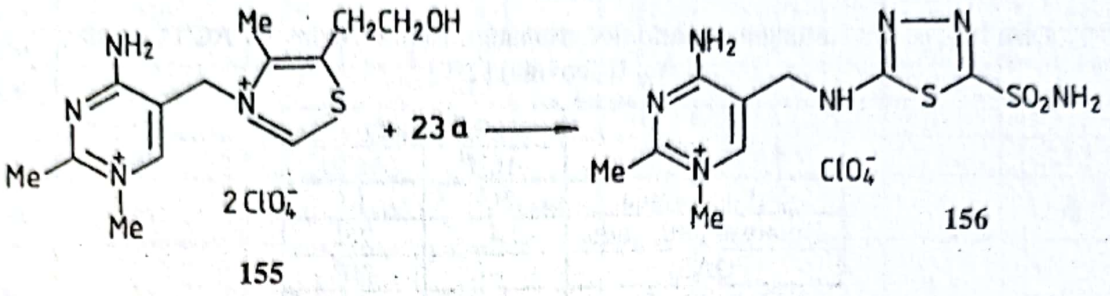


Compușii de tipul **153** au fost preparați prin acilarea aminei **23a** cu halogenuri de acil conținând grupări cationice în moleculă (similar cu ceilalți derivați de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida, discutați în secțiunea 5.1.2.), în prezența piridinei, sau prin cuaternizarea unor amine terțiare cu halogeno-acetamido-derivații de tipul **154** (schema 24) [198].



Schema 24

Un alt gen de sinteză a constat în tratarea aminei **23a** (5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida) cu bis-percloratul de 1-metil-tiaminiu (compusul **155**), obţinându-se sulfonamida cationică conţinând gruparea de pirimidiniu **156** (schema 25) [198].

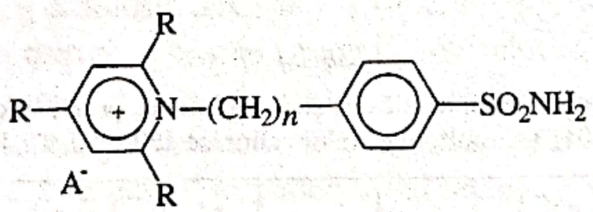


155 **156**

Schema 25

O constatare surprinzătoare a apărut în momentul testării acţiunii inhibitorii a compuşilor **153a-c** şi **156** care erau aproape lipsiţi de proprietăţi de inhibiţie asupra izozimei AC II bovine, având valori IC_{50} de peste 10^{-4} M, fiind singurele sulfonamide heterociclice cu o astfel de comportare stranie [198]. De menţionat însă că sulfonamidele cationice **153d,e** au dovedit a avea acţiune inhibitorie enzimatică cu valori IC_{50} comparabile cu ale acetazolamidei (aproximativ 10^{-8} M – pentru izozima bovină AC II) [198]. Aceasta semnifică că prezenţa unei sarcini pozitive în molecula unui IAC, nu conduce neapărat la pierderea proprietăţilor inhibitorii ale compusului respectiv. Din acest considerent, această linie de cercetare nu a fost părăsită, cu toate că primii compuşi obişnuiţi (de tipul **153**) nu erau inhibitori enzimatici eficace.

O strategie nouă de sinteză a compuşilor de tip IAC a fost aceea prin care s-au utilizat sărurile de piriliu pentru a introduce gruparea cationică (de piridiniu substituit) în molecula unui inhibitor enzimatic [250].



157 **a**: $n = 0$ R = Me, Ph
b: $n = 1$

Reacţii ale unor amine aromatice (conţinând şi grupări sulfonamidice în moleculă) cu săruri de piriliu au fost raportate de către Neidlein şi Winterzens [248] pentru sulfanilamidă, şi de către Dinculescu şi Balaban [249] pentru homosulfanilamidă. Derivaţii obişnuiţi, de tipul **157a,b** nu au fost testaţi însă ca IAC.

Ţinând cont că astfel de compuşi de tipul **157** posedă grupări sulfonamidice nesubstituite, ei au fost recent testaţi pentru capacitatea de a inhiba izozimele AC I şi AC II (tabelul 35) [250].

Din datele tabelului 35 se observă că unele sulfonamide aromatice cationice (precum **157bA**; **157bB**) sunt IAC deosebit de eficace, (pentru izozima AC II) chiar mai puternici decât sulfonamida de la care derivă. Faţă de izozima AC I aceşti inhibitori sunt aproximativ la fel de eficace ca şi sulfanilamida. Întrucât sulfonamidele heterociclice se comportă ca IAC mai puternici, decât sulfonamidele

Scanned with OKEN Scanner

aromatice, Supuran şi colab. [250, 251] şi-au propus a lărgi sfera IAC prin obţinerea de inhibitori cationici posedând grupări de piridiniu substituite (ca şi la derivaţii **157**), dar care să fie ataşate de inele heterociclice.

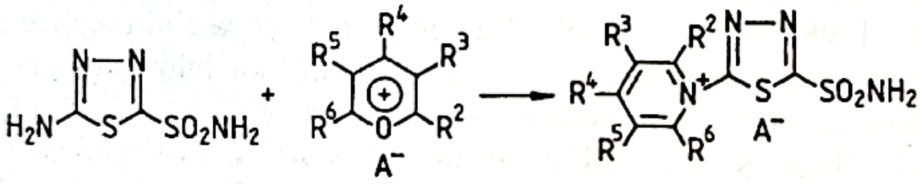
Tabelul 35

Date IC_{50} pentru sulfonamide cationice aromatice asupra izozimelor AC I (umană) şi AC II (bovină) [250].

Compus	IC_{50} (μM)	
	AC I	*AC II*
Sulfanilamida	50[a]	13
Homosulfanilamida	–	25[b]
QAS	–	30[b]
157aA (R = Me)	61	14
157aB (R = Ph)	79	28
157bA (R = Me)	43	0,5
157bB (R = Ph)	62	1,8

[a] Ref. [156]; [b] Ref. [16].

Rezultatul eforturilor de sinteză a fost raportarea unei noi serii de astfel de compuşi [250, 251] (schema 26; tabelul 36).



23 a **158** **159**

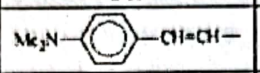
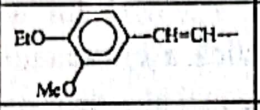
Schema 26

Tabelul 36

Date IC_{50} (faţă de AC I umană, prin tehnica EI şi AC II bovină, prin tehnica SEI a metodei Maren [201]) ale sulfonamidelor cationice **159** [250, 251].

159	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	IC_{50} (μM)	
						AC I	AC II
Aa	Me	H	Me	H	Me	31	86
Ab	Et	H	Me	H	Et	24	3
Ac	*i*-Pr	H	Me	H	Me	21	4
Ad	*t*-Bu	H	Me	H	Me	19	2
Ae	*i*-Pr	H	Me	H	*i*-Pr	18	24
Af	*t*-Bu	H	Me	H	*t*-Bu	16	21
Ag	Me	H	*t*-$BuCH_2$	H	Me	6	33
Ah	Et	H	*t*-$BuCH_2$	H	Et	6	104
Ai	*i*-Pr	H	*t*-$BuCH_2$	H	*i*-Pr	7	11
Ba	Ph	H	Me	H	Me	0,5	0,3
Bb	2-MeC_6H_4	H	Me	H	Me	0,8	0,1
Bc	2- ClC_6H_4	H	Me	H	Me	2,9	87
Bd	Me	H	Ph	H	Me	0,3	0,4
Be	Et	H	Ph	H	Et	0,2	0,1

Scanned with OKEN Scanner

Bf	*n*-Pr	H	Ph	H	*n*-Pr	0,9	0,5
Bg	*i*-Pr	H	Ph	H	*i*-Pr	0,7	0,2
Bh	Me	Ph	Me	H	Me	111	172
Bi	Me	Me	Ph	H	Me	1,5	14
Ca	Me	H	Ph	H	Ph	95	169
Cb	Ph	H	Me	H	Ph	118	178
Cd	2-MeC_6H_4	H	Me	H	2-MeC_6H_4	125	92
Ce	4-MeC_6H_4	H	Me	H	4-MeC_6H_4	148	231
Cf	Ph	H	Ph	H	Ph	132	112
Da	Me	H		H	Me	1	6
Db	Me	H		H	Me	1,5	11
Ea	Me	Me	Me	H	Me	31	5
Eb	Me	Me	$-(CH_2)_4-$		Me	1	3
Ec	Me	$R^3, R^5 = (CH_2)_9$; R^4=Me			Me	4	1,5

Prin reacţia 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamidei cu săruri de piriliu tri-, tetra- sau pentasubstituite (158) au fost preparate sărurile de piridiniu de tipul **159**, conţinând diverşi substituenţi alifatici-, aromatici- sau nesaturaţi, precum şi combinaţii ale acestora, la inelul de piridiniu. Compuşii astfel preparaţi au fost testaţi pentru acţiunea inhibitorie asupra izozimelor AC I (umană) şi AC II (bovină) [250, 251]. Deşi aparent aceşti compuşi par a fi inhibitori mai puternici ai izozimei AC I, (tabelul 36), aceasta nu corespunde realităţii întrucât determinările valorilor IC_{50} s-au realizat prin două metode diferite. Astfel în determinările asupra AC II s-a utilizat tehnica SEI (substrat-enzimă-inhibitor) [250] pe când în determinările care au utilizat AC I, s-a folosit tehnica E-I (enzimă-inhibitor) [251]. Diferenţa majoră între cele două metode, constă în faptul că în tehnica E-I, se preincubează soluţiile de enzimă şi inhibitor, timp de 10-15 minute pentru a se realiza formarea complexului E-I. Metodologia tehnicii SEI, exclude preincubarea, soluţiile de substrat (CO_2), enzimă şi respectiv inhibitor, fiind adăugate succesiv, în celula în care se fac determinările. După cum a evidenţiat Maren [16] încă de la introducerea metodei SEI, prin această tehnică se obţin valori IC_{50} mai mari (chiar de 102 ori) comparativ cu aceleaşi date obţinute prin metoda E-I. Din acest motiv inhibitorii testaţi conform primei metode, par a fi mai slabi decât în realitate. Acesta este şi cazul determinărilor paralele pentru compuşii **159**, care, ca şi majoritatea sulfonamidelor heterociclice, sunt inhibitori mai puternici ai izozimei AC II.

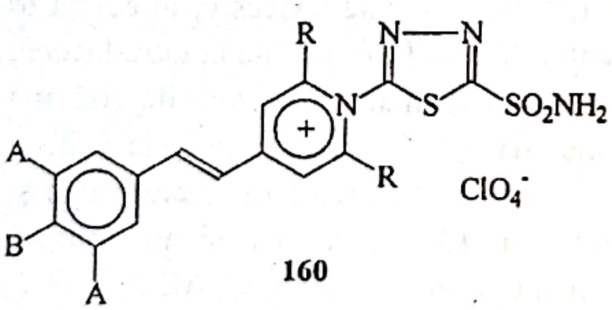
Pentru sulfonamidele cationice sintetizate, de tipul **159**, s-a observat că factorul determinant în a genera o activitate inhibitorie mare asupra anhidrazei carbonice este natura grupărilor R^2-R^6, de la nucleul de piridiniu, şi este aproape nerelevant numărul acestora. În sprijinul acestei constatări, vin rezultatele asupra ambelor izozime ale AC (I şi II), care au decelat compuşii foarte activi atât între derivaţii trisubstituiţi (**159A** şi **B**), cât şi pentru tetrasubstituiţi (**159Bi, Ea**) pentasubstituiţi (**159Eb, Ec**). În general, compuşii posedând ca substituenţi la

Scanned with OKEN Scanner

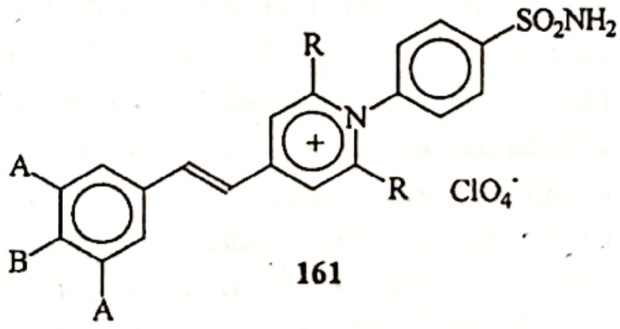
inelul de piridiniu numai grupări alchil, sau un aril şi restul grupărilor alchil au fost mult mai activi ca IAC, comparativ cu derivaţii posedând două sau trei astfel de grupări aril. Sugestive sunt exemplele cu compuşii **159 Ca-f**, care au valori IC_{50} peste 100 μM, pentru ambele izozime, prin amândouă tehnicile de testare. Probabil, că existenţa a mai mult de o grupare aril ca substituent la inelul de piridiniu face ca derivatul respectiv să devină foarte voluminos şi împiedicat steric, ceea ce interferă cu accesul inhibitorului la situsul activ al enzimei. Prin contrast, se pare că anumiţi substituenţi alchilici mai voluminoşi (ca de exemplu *iso*-propil; *terţ*-butil; *neo*-pentil) sunt benefici pentru eficienţa ca IAC a compuşilor care îi conţin (**159 Ad-Ai**). Şi în aceste situaţii, creşterea concomitentă a volumului a trei substituenţi (compusul **159Ah**) conduce la o micşorare dramatică a eficacităţii ca IAC, comparativ cu alţi derivaţi înrudiţi. Rezultatele sunt valabile mai ales pentru AC II (tabelul 36).

Se pare că substituţia optimă este cea care include un rest aril în poziţia 2- sau 4- a inelului de piridiniu, şi restul grupelor alchilice. Cei mai activi IAC din această serie sunt cei cu astfel de substituţii: **159Ba**, **Bb**, **Bd-Bg**. O excelentă activitate au prezentat şi cei doi derivaţi cu grupări de stiril-piridiniu, **159 Da,b** care din punct de vedere formal pot fi consideraţi ca aparţinând tot tipului de substituţie amintit mai sus.

Recent, gama compuşilor posedând grupări de stiril-piridiniu a fost extinsă [252] prin raportarea sintezei şi determinarea proprietăţilor IAC ale unor derivaţi de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamidă (**160**). Noii derivaţi sunt similari compuşilor **159** deja discutaţi, dar prezintă o mai mare varietate de substituenţi în poziţiile 2 şi 6 ale inelului de piridiniu. Derivaţii similari de sulfanilamidă (de tipul **161**) au fost de asemenea raportaţi [252]. Proprietăţile de inhibiţie ale acestor compuşi faţă de izozima AC II sunt similare cu cele ale inhibitorilor **157** şi **159**. În plus, datorită faptului că inhibitorii de tipul **160** şi **161** sunt intens coloraţi, în diverse nuanţe de galben, roşu, verde, albastru etc., au fost utilizaţi la studiul spectroscopic al interacţiilor enzimă-inhibitor (prin spectroscopie UV-VIS) [252].



160



161

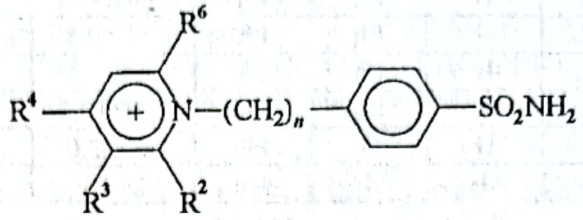
R = Me, Ph
A = B = MeO
A = H, B = Me_2N

Bunele rezultate obţinute cu inhibitorii cationici de tipul **157**, **159-161** au impus lărgirea cercetărilor în acest domeniu. Astfel, au fost sintetizaţi şi testaţi ca IAC compuşii de tipul **162**, derivaţi sulfanilamida, homosulfanilamida şi *p*-aminoetilbenzensulfonamida (tabelul 37) [253].

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 37

Inhibiția AC II bovine cu sulfonamidele cationice de tipul **162** (activitatea enzimatică determinată prin metoda esterazică [201].



162

162	*n*	R^2	R^3	R^4	R^6	K_I #		
						CA I[a] (μM)	CA II[a] ($\times 10^{-8}$M)	CA IV[b] ($\times 10^{-8}$M)
a	0	Me	H	Me	Me	10±0.5	15±1.7	29 ±1.0
b	0	Me	H	Ph	Me	7±1.1	6 ± 0.8	21±1.1
c	0	Et	H	Ph	Et	6±0.5	6±0.3	18±0.2
d	0	*n*-Pr	H	Ph	*n*-Pr	10±0.6	12±1.1	19±0.4
e	0	*i*-Pr	H	Ph	*i*-Pr	5±0.4	5± 0.2	9±0.6
f	0	Me	H	Ph	Ph	40±0.4	21±0.7	85±2.2
g	0	Et	H	Ph	Ph	43±0.2	40±2.5	130±0.9
h	0	*n*-Pr	H	Ph	Ph	140±2.5	58±1.1	148±3.6
i	0	*i*-Pr	H	Ph	Ph	125±0.7	44±0.9	210±2.4
j	0	*n*-Bu	H	Ph	Ph	305±10	62±1.0	215±5.1
k	0	Ph	H	Ph	Ph	290±5.2	51±3.0	250±9.0
l	0	Me	Me	Me	Me	5±0.5	4±0.2	6±0.1
m	1	Me	H	Me	Me	7±0.1	5±0.2	9±0.2
n	1	*i*-Pr	H	Me	Me	6±0.1	5±1.1	8±0.9
o	1	*i*-Pr	H	Me	*i*-Pr	11±0.5	8±1.3	14±0.4
p	1	Me	H	Ph	Me	4±0.2	2±0.3	7±0.5
q	1	Et	H	Ph	Et	2±0.9	2±0.3	5±0.2
r	1	*n*-Pr	H	Ph	*n*-Pr	24±1.1	9±0.2	16±0.3
s	1	*i*-Pr	H	Ph	*i*-Pr	12±0.1	6±0.1	10±0.5
t	1	Me	H	Ph	Ph	32±0.2	12±0.1	16±1.0
u	1	Et	H	Ph	Ph	42±1.4	31±1.4	98±3.2
v	1	*n*-Pr	H	Ph	Ph	130±5.3	39±1.7	126±2.0
x	1	*i*-Pr	H	Ph	Ph	112±2.1	37±0.8	121±1.4
y	1	*n*-Bu	H	Ph	Ph	300±5.9	59±3.5	210±2.4
z	1	*t*-Bu	H	Ph	Ph	110±3.6	32±1.1	107±0.4
aa	1	Ph	H	Ph	Ph	280±4.5	47± 2.9	195±6.0
ab	1	Ph	H	H	Ph	280±0.1	49±3.7	195±2.4
ac	1	Me	Me	Me	Me	3±0.1	3±0.5	5±0.9
ad	2	Me	H	Me	Me	4±0.2	2±0.1	6±0.6
ae	2	*i*-Pr	H	Me	Me	2±0.3	1.5±0.1	3±0.2
af	2	*i*-Pr	H	Me	*i*-Pr	3±0.1	2±0.1	7±0.1
ag	2	Me	H	Ph	Me	1±0.2	0.8±0.2	2±0.3
ah	2	Et	H	Ph	Et	1±0.5	0.9±0.2	2±0.1
ai	2	*n*-Pr	H	Ph	*n*-Pr	7±0.1	4±0.2	8±0.2
aj	2	*i*-Pr	H	Ph	*i*-Pr	6±0.1	2±1.1	7±0.5

Scanned with OKEN Scanner

ak	2	Me	H	Ph	Ph	18±0.5	10±1.3	14±0.4
al	2	Et	H	Ph	Ph	40±0.?	22±0.3	76±3.1
am	2	*n*-Pr	H	Ph	Ph	112±4.9	27±0.3	105±5.0
an	2	*i*-Pr	H	Ph	Ph	94±3.1	35±0.2	86±3.9
ao	2	*n*-Bu	H	Ph	Ph	290±8.5	54±4.0	200±8.5
ap	2	*t*-Bu	H	Ph	Ph	92±2.8	27±1.5	100±6.0
aq	2	Ph	H	Ph	Ph	270±10.5	41±1.9	183±4.0
ar	2	Ph	H	H	Ph	265±2.0	42±1.0	190±5.1
as	2	Me	Me	Me	Me	2±0.1	1±0.1	2±0.1

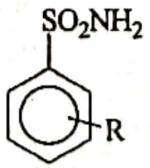
Media (eroare standard (n=2). [a] Izozime umane clonate. [b] Izozima bovină.

Compuşii de tipul **162**, raportaţi recent de Supuran, Ilieş şi colab. [253] sunt unicii IAC non-macromoleculari cu specificitate pentru izozima asociată membranelor celulare, AC IV. Studiul menţionat mai sus [253] a demonstrat că *in vivo* aceşti compuşi nu penetrează prin membranele plasmatice, inhibând astfel doar izozima AC IV, chiar în prezenţa unor mari cantităţi de izozime citozolice (AC I şi AC II).

5.5. Relaţii cantitative structură chimică – activitate biologică (QSAR) pentru inhibitorii anhidrazei carbonice

De la descoperirea IAC şi până în prezent, au fost raportate mai multe studii cantitative, care stabilesc corelaţii de tip structură chimică – activitate biologică (QSAR = quantitative structure activity relationship).

Kakeya şi colab. [254, 255] au utilizat metoda Hansch-Fujita [256] pentru a corela puterea de inhibiţie asupra AC umane, a unei serii de 19 benzensulfonamide substituite de tipul **163**. Parametrii fizico-chimici (descriptori) cercetaţi au fost: pK_a-ul grupării sulfonamidice; deplasarea chimică ^{1}H-RMN a protonilor SO_2NH_2; constante de forţă a legăturilor S=O (determinate din spectrele de vibraţie). De asemenea, pe lângă aceşti parametrii determinanţi au fost calculaţi o serie de alţi parametrii ca: factorul Hammett σ, parametrii hidrofobi (π, β, constantele sterice (E_S) etc. Concluzia generală a acestor studii a fost că grupările atrăgătoare de electroni (halogeno; alcoxi; nitro – în special în poziţiile *meta* şi *para*), prin descreşterea valorii pK_a a sulfonamidei, conduc la IAC cu activitate mai bună, explicând astfel datele corespunzătoare constatate experimental cu mult timp înainte [16, 14, 197].



163 R: *o*-; *m*-; *p*-MeNH, H_2N, MeO, Me, halogeno, NO_2 etc.

Pentru acelaşi tip de IAC (benzensulfonamide substituite), Hansch şi colab. [257] au stabilit următoarea ecuaţie care leagă activitatea biologică (exprimată sub forma constantei de afinitate a inhibitorului pentru enzima, K), de diverşi parametrii calculaţi sau determinaţi experimental:

Scanned with OKEN Scanner

$$\lg K = 1{,}55 * \sigma + 0{,}64 * \lg P - 2{,}07 * I_1 - 3{,}28 * I_2 + 6{,}94 \qquad (25)$$

unde:

σ = constanta electronică de substituent Hammett;

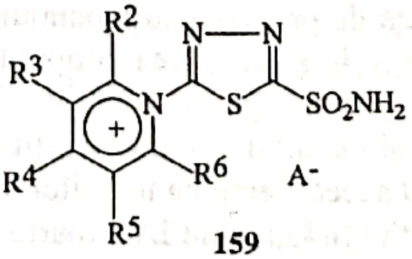
P = coeficient de partiţie octanol/apă;

I_1, I_2 = variabile de indicare a substituenţilor (având valorile 0 şi 1), care includ împiedicările sterice pentru inhibitorii *o*- şi *m*-substituiţi; constanta de afinitate a inhibitorului pentru enzima, K este exprimată în M^{-1} [257].

Cercetările lui Hansch şi colab. [86-88] deşi realizate pe compuşi foarte similari ca structură chimică, au condus la rezultate foarte diferite, ceea ce implică problema omisiunii anumitor factori importanţi, probabil legaţi de mărimea moleculei inhibitorului, printre altele. Urmărind acelaşi scop de corelare al structurii chimice cu activitatea biologică, de inhibiţie a anhidrazei carbonice, Menziani şi colab. [258] au propus modele matematice mai elaborate. Astfel, pentru 20 de inhibitori de tipul **163** au fost calculate energiile de legare de enzimă, demonstrându-se că discrimarea AC pentru diferiţii inhibitori, este dominată în principal de forţele van der Waals, şi nu de interacţiuni electrostatice. În acest studiu, cu scopul optimizării geometriilor şi conformaţiilor moleculare ale inhibitorilor, au fost utilizate metode de orbitali moleculari semiempirice, de tipul AM1 [258].

De Benedetti şi colab., utilizând aceleaşi metode de orbitali moleculari, au raportat câteva studii QSAR pentru inhibitori ai AC din diverse clase de sulfonamide: benzen-sulfonamide substituite, bis-sulfonamide, diarilsulfonamide [259] şi derivaţi 5-substituiţi de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamidă [260]. În aceste studii, descriptorii de tip OM (orbital molecular) au fost calculaţi utilizând abordarea CNDO/2 (complete neglect of differential overlap). Corelaţiile obţinute prin analiza de regresie liniară, au arătat că etapele (hidrofile/hidrofobe) favorizate apar la interacţia enzimă-inhibitor. În cazul în care gruparea sulfamoil este sărăcită în electroni (de efectul altor substituenţi prezenţi în molecula inhibitorului), şi molecula acestuia conţine heteroatomi, se constituie caracteristicile care conferă, în general, o hidrosolubilitate crescută compusului respectiv. Astfel de metode pot fi utilizate cu succes în design-ul raţional de noi IAC [261].

Recent, Clare şi Supuran [262, 262a,b], utilizând metoda CNDO/2, analiza de regresie, cele mai mici pătrate parţiale etc., au raportat câteva studii QSAR pentru mai multe clase de sulfonamide cu proprietăţi IAC. Astfel, pentru 28 de sulfonamide cationice de tipul **159**, aceşti autori au ajuns la concluzii similare celor ale lui De Benedetti şi colab. [90-93], în sensul că parametrii care controlează eficacitatea unui compus din această serie ca IAC, sunt cei electronici. Mai precis, importantă este densitatea electronică la inelul de piridiniu şi cel tiadiazolic a compuşilor **159**, pe când sarcina electrică, sau efectele hidrofobe au o importanţă mult mai redusă [262].



159

Scanned with OKEN Scanner

5.6. Sulfonamidele alifatice ca inhibitori ai anhidrazei carbonice

Maren [16], investigând derivaţii sulfonamidici alifatici, de tipul $R\text{-}SO_2NH_2$ ($R = Me; PhCH_2$) ca IAC, a demonstrat că aceştia, spre deosebire de sulfonamidele aromatice şi heterociclice, sunt inhibitori deosebit de slabi, având valori IC_{50} în jur de 10^{-4} M. Slaba activitate inhibitorie asupra anhidrazei carbonice a fost corelată cu absenţa ciclului (aromatic/heterociclic) din molecula inhibitorului, care ar influenţa activitatea compusului pe două căi:

1) printr-un efect de acidifiere ale resturilor aril/hetaril (secţiunea 5.5.);

2) şi prin faptul că elementul voluminos din molecula inhibitorului participă la interacţiuni hidrofobe, van der Waals, şi la formarea de legături de hidrogen cu resturi de aminoacizi din situsul activ al enzimei (secţiunea 4.2.), conducând astfel la o puternică stabilizare a complexului enzimă-inhibitor. Aceste date, privind slaba acţiune de inhibiţie a AC, a derivaţilor sulfonamidici alifatici, nu pot fi generalizate pentru orice clasă de derivaţi de acest tip, deoarece există şi anumite tipuri de sulfonamide alifatice care sunt deosebit de eficace ca IAC [157].

Tabelul 38

Inhibiţia AC II cu sulfonamide alifatice

$R\text{-}SO_2NH_2$

164	R	pK_a	K_I[a] (M)
a	CH_3	10,5	10^{-4}
b	$ClCH_2$	9,2	$7*10^{-6}$
c	F_3CCH_2	9,1	$2*10^{-6}$
d	FCH_2	9,0	10^{-6}
e	F_2CH	7,5	$8*10^{-8}$
f	Cl_3C	6,5	$2*10^{-8}$
g	C_4F_9	6,2	$5*10^{-9}$
h	C_2F_5	6,0	10^{-8}
i	F_3C	5,8	$2*10^{-9}$
j [b]	Clişeul 53	–	$4,3*10^{-6}$

[a] Din ref. [157] faţă de AC II canină.
[b] Din ref. [263] faţă de AC II umană.

În tabelul 38 sunt prezentate constantele de inhibiţie (K_I), precum şi valorile pK_a pentru câteva halogeno/poli-halogeno-alchil-sulfonamide (**164b-i**) comparativ cu metansulfonamida, **164a**, şi datele pentru 3-sulfamoilmetil-1,2-benzizoxazolul (**164j**), un medicament antiepileptic recent introdus în clinică (denumit „zonisamida") [263], care posedă, de asemenea, proprietăţi IAC.

Se observă că introducerea de atomi de halogen (clor şi în special fluor), în poziţiile 1 şi respectiv 2 faţă de gruparea sulfonamidică are drept efect acidifierea puternică a protonilor SO_2NH_2 şi creşterea proprietăţilor IAC pentru compuşii respectivi.

Practic, triclorometil şi pentafluoroetil-derivaţii (**164f,h**) sunt comparabili cu acetazolamida (**23b**), având aceeaşi acţiune inhibitorie asupra anhidrazei carbonice, în timp ce perfluoro-derivaţii (**164g,i**) sunt IAC foarte puternici. Triflilamida **164i** a

Scanned with OKEN Scanner

fost investigată şi din punct de vedere farmacologic, dovedindu-se [157] că posedă proprietăţi importante de reducere a presiunii intraoculare elevate (în modele animale de glaucom), când este administrată pe cale topică. Dacă compusul nu ar fi fost toxic, ar fi devenit probabil, medicamentul cu structura cea mai simplă, puţin mai complicată decât a acidului acetic.

Zonisamida **164j** deşi nu este înrudită structural cu celelalte sulfonamide alifatice discutate anterior, manifestă totuşi acţiune de IAC. Aceasta este mai slabă decât a triflilamidei de aproximativ 1000 de ori [263]. Introducerea zonisamidei în terapia clinică, ca antiepileptic, a ridicat din nou problema relaţiilor dintre epilepsie şi inhibitorii AC, deoarece utilizarea în acelaşi scop a unor compuşi importanţi din această clasă (ca de exemplu acetazolamida, metazolamida) au dat rezultate controversate (secţiunea 8).

Tabelul 39

Principalele tipuri de sulfonamide IAC, şi constantele lor de inhibiţie K_I (faţă de izozime de tipul II)

Inhibitor	Reprezentant tipic	K_I (M)
Sulfonamida alifatică	Triflilamida	$10^{-4} - 10^{-6}$
Sulfonamida aromatică	Sulfanilamida Diclorofenamida	$10^{-6} - 10^{-8}$
Sulfonamida heterociclică	Acetazolamida Metazolamida Etoxzolamida	$10^{-8} - 10^{-9}$
Sulfonamida *N*-modificată	–	$10^{-4} - 10^{-7}$
Sulfonamida cationică	–	$10^{-6} - 10^{-8}$

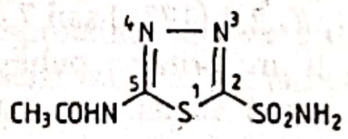
Cercetând datele tabelului 39, se poate afirma că, în prezent, este posibil design-ul oricăror IAC puternici, din orice clasă de sulfonamide, introdusă în tabel. Totodată, „dogme" care păreau de nerăsturnat în cercetarea inhibitorilor acestei enzime, s-au dovedit a fi nefondate, în timp ce IAC foarte eficace au apărut din clasa sulfonamidelor alifatice sau *N*-substituite [155, 194].

Scanned with OKEN Scanner

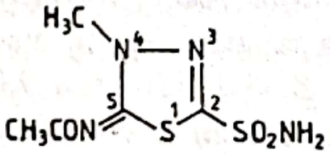
6. COMBINAȚIILE COMPLEXE CA INHIBITORI AI ANHIDRAZEI CARBONICE

Dacă combinațiile complexe ale sulfanilamidelor substituite care au activitate antibacteriană, întocmai ca și complexul sulfadiazinei cu Ag(I) deosebit de eficace în tratamentul arsurilor au fost extensiv studiate [264], complecșii sulfonamidelor cu proprietăți IAC au fost doar relativ puțin investigați până în prezent [104, 265]. Sintetizând noi derivați ai acetazolamidei și a altor sulfonamide heterociclice/aromatice conținând ioni ai metalelor tranziționale, Supuran și colab [104] au impus o nouă clasă de IAC, cu o eficiență deosebită. Domeniul a fost apoi extins, demonstrându-se mecanismul de acțiune al acestor inhibitori duali [173a] (vezi secțiunea 4.3).

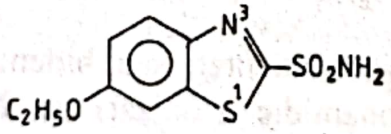
Liganzii utilizați în astfel de studii au fost constituiți de sulfonamide recunoscute pentru proprietățile lor de IAC, unele cu utilizări clinice (acetazolamida = HAAZ; metazolamida = HMZA; etoxzolamida = HEZA), pe când pentru altele, aceste proprietăți IAC au fost recent dovedite {zaharina = HSAC; tosilhidrazida = TSN derivații de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (ca de exemplu sulfonamidele cationice $H(L^+)$ = HCTS; sau derivatul cu restul tioureido = HTTS)}.



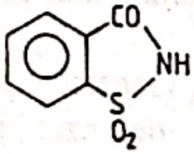
HAAZ



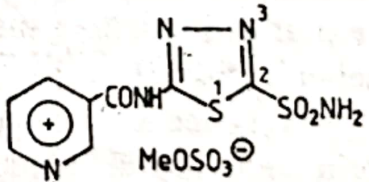
HMZA



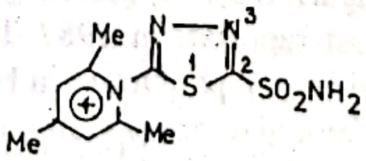
HEZA



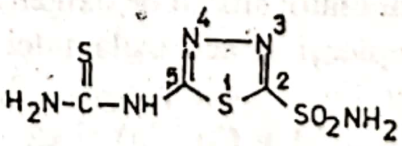
HSAC



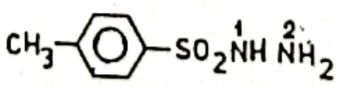
$H(L^+)$



HCTS



HTTS



TSH

Scanned with OKEN Scanner

În formulele liganzilor de mai sus, a fost evidenţiat protonul sulfonamidic, acid, care în general nu este regăsit în compoziţia complecşilor. Practic, în marea lor majoritate, liganzii sulfonamidici menţionaţi acţionează în stare anionică (R-SO_2NH), astfel că aceste combinaţii complexe pot fi formulate în general: $M(SA)_n$, unde SA este sulfonamida ionizată corespunzătoare (de exemplu: $M(AAZ)_n$; $M(EZA)_m$; $M(SAC)_p$ etc.). Există şi câteva combinaţii, în care ligandul sulfonamidic acţionează în stare neutră (R-SO_2NH_2).

6.1. Complecşi ai acetazolamidei

Dintre sulfonamidele utilizate pentru prepararea de combinaţii complexe, acetazolamida (HAAZ) este reprezentantul cel mai important, pe de o parte datorită importanţei clinice *per se* a acestui compus, iar pe de altă parte deoarece este ligandul cel mai investigat. Sub acest ultim aspect, au fost raportaţi o multitudine de complecşi ai săi, atât cu cationi ai metalelor tranziţionale, cât şi cu cei ai metalelor din grupele principale [265-276]. Din punctul de vedere al chimiei coordinative, acetazolamida este un ligand destul de complicat datorită următorilor factori:

a) prezenţa unei multitudini de atomi donori în molecula sa (atomii N^3 şi N^4 endociclici, precum şi atomul de sulf; cei doi atomi de azot exociclici, al grupării acetamido şi respectiv sulfonamido; atomii de oxigen ai grupării sulfonamidice);

b) echilibrelor acido-bazice la care poate participa, prin prezenţa a două grupări acide în molecula sa: gruparea sulfonamidică (pK_a 7,2 [173b] sau 7,4 [16]) şi cea acetamidică (pK_a 8,65 [173b] sau 9,0 [16]). În majoritatea publicaţiilor aceste valori sunt atribuite eronat, considerându-se restul acetamidic mai acid (pK_a^* în jur de 7), decât cel sulfonamidic [277].

Combinaţiile complexe ale acetazolamidei preparate până în prezent implică aproape toţi atomii/grupările menţionate mai sus, în a participa la interacţiuni cu ionii metalici [265-277].

În general, acetazolamina acţionează ca ligand bidentat, sau bidentat în punte, prin intermediul atomilor de azot sulfonamidic (ionizat) şi N^3/N^4 endociclici. Au fost însă evidenţiate şi combinaţii complexe în care HAAZ este ligand monodentat, coordinând prin atomul de azot sulfonamidic, prin atomul de azot N^4, sau printr-unul dintre atomii de oxigen ai grupării SO_2NH_2 [265-277]

Primii complecşi ai acetazolamidei au fost raportaţi în 1987 de grupul lui Borras [265]. Aceştia sunt complecşi ai Co(II) şi Zn(II), preparaţi din HAAZ, MCl_2 în soluţie alcoolică (M = Co, Zn) şi exces de amoniac apos. Compuşii rezultaţi, $[Co(AAZ)_2(NH_3)_2]$ (**165**) şi $[Zn(AAZ)_2(NH_3)_2]$ (**166**), au fost caracterizaţi pe baza analizei şi spectroscopiei IR, UV-VIS, ^1H- şi ^{13}C-RMN, precum şi analizei termo-gravimetrice [265]. Pe baza acestor date celor doi complecşi nu li s-a putut atribui o structură neechivocă; s-a stabilit în schimb că ionii metalici sunt într-o

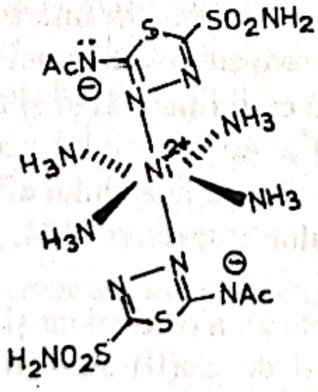
* Valorile pK_a raportate sunt funcţie de metoda de determinare.

Scanned with OKEN Scanner

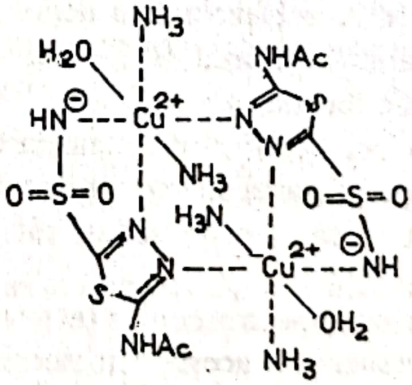
Scanned with OKEN Scanner

înconjurare pseudo-tetraedrică, şi că gruparea sulfonamidică a ligandului este deprotonată şi în interacţiune cu ionii metalici. Aceasta deoarece s-au evidenţiat deplasări spre numere de undă mai mici ale frecvenţelor de vibraţie SO_2 în spectrele IR ale complecşilor, comparativ cu aceleaşi frecvenţe din spectrul ligandului. În spectrele electronice în soluţie(în DMSO sau DMF) ale complecşilor, maximul de absorbţie al sulfonamidei apărea în forma $ArSO_2NH^-$ [265-276]. Se pare astfel, că în aceşti complecşi, acetazolamida acţionează ca ligand monodentat, legându-se de ionii de Co(II) şi Zn(II) prin atomul de azot sulfonamidic (în stare ionizată).

În 1989, acelaşi grup spaniol a sintetizat şi stabilit structura tridimensională a complexului acetazolamidei cu Ni(II), preparat de asemenea în prezenţa unui exces de amoniac (în soluţie alcoolică) [266]. În acest complex, **167**, $[Ni(AAZ)_2(NH_3)_4]$, ligandul coordinează ionul de Ni(II) (având o geometrie tetraedrică uşor distorsionată) prin intermediul atomului de azot N^4. Spectrele IR ale complexului au permis a stabili faptul că ligandul este din nou în stare deprotonată, dar nu la gruparea sulfonamidică, ci la cea acetamidică. În aceste spectre vibraţiile SO_2 nu mai sunt deplasate la numere de undă mai mici, în timp ce vibraţia C=O (care în spectrul acetazolamidei apare la 1672 cm^{-1}, iar în cele ale complecşilor la 1659 şi respectiv 1705 cm^{-1}) este scindată. Aspectul este acela al unei benzi slabe, la 1681 cm^{-1} şi al uneia mai intense, la 1624 cm^{-1} [266]. Această modificare a valorilor pK_a a celor două grupări acide din molecula acetazolamidei, poate fi atribuită prezenţei ionului de Ni(II) în proximitatea restului acetamidic, care astfel devine mai acid decât gruparea SO_2NH_2. Efectul nu este caracteristic, ci comun, în special pentru metalo-proteine, în care prezenţa unui ion metalic în vecinătatea unor resturi de aminoacizi, modifică semnificativ aciditatea grupărilor respective [86, 94].



167

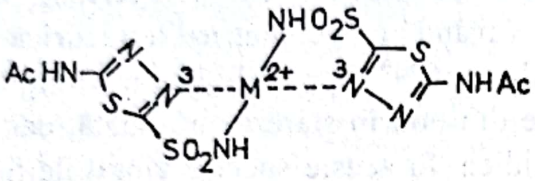


168

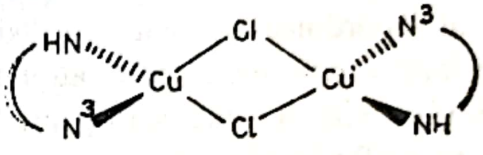
Aceeaşi autori [268] care au sintetizat complecşii HAAZ cu Co(II), Zn(II) şi Ni(II) au raportat structura complexului dinuclear de Cu(II), **168**, $[Cu(AAZ)(NH_3)_2(OH_2)]_2 \cdot 2H_2O$. În acest complex, acetazolamida acţionează ca ligand tridentat, în punte, pe de o parte prin atomul de azot sulfonamidic (ionizat) şi a celui N^3, în interacţie fiecare cu câte un ion de Cu(II), iar pe de altă parte, prin cei doi atomi de azot endociclici N^4, care coordinează în punte celălalt ion de

Cu(II), în poziţii axiale. Restul poziţiilor de coordinare sunt ocupate de câte două molecule de amoniac şi una de apă. Ionii metalici au o geometrie octaedrică elongată tetragonal. Compusul **168** nu este foarte stabil la temperatura camerei, evidenţiindu-se că pierde în timp amoniac [268].

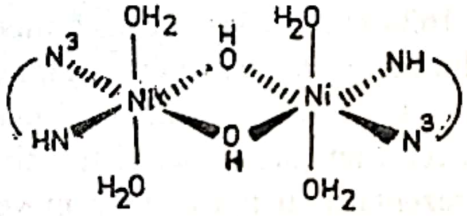
Alţi complecşi ai Cu(II) cu acetazolamida au fost preparaţi de Supuran şi Andruh [104], utilizând sarea de sodiu a sulfonamidei şi săruri de Cu(II), în metanol, la reflux, cu diverse rapoarte molare ale reactanţilor. Au fost izolaţi doi compuşi: $[Cu(AAZ)_2]$ (**169**) şi $[Cu(AAZ)Cl]_2$ (**170**). Structura acestor doi complecşi de Cu(II), precum şi a celor de Zn(II), **171**, $[Zn(AAZ)_2]$, şi de Ni(II), **172**, $[Ni(AAZ)(OH)(OH_2)_2]_2 \cdot 6H_2O$ (binuclear), preparaţi în cursul aceluiaşi studiu, [104] sunt redate mai jos :



169 : M = Cu (II)
171 : M = Zn (II)



170



172

În aceşti compuşi, ca şi în marea majoritate a complecşilor preparaţi din sarea de sodiu, acetazolamida acţionează ca ligand bidentat în interacţiunea cu ionii metalici. Aceasta se realizează prin intermediul atomului de azot sulfonamidic ionizat (simbolizat prin NH, începând cu formula **170**) şi a atomului de azot endociclic N^3 (simbolizat în continuare N^3). Acest mod de coordinare a rezultat din analizarea spectrelor de vibraţie şi UV atât ale ligandului aflat în stare neutră, cât şi ca sare de sodiu, cât şi complecşilor respectivi [104, 265, 267, 270-277].

Din studii spectroscopice (electronice, RPE etc.) s-a determinat şi geometria ionilor metalici din aceşti complecşi. Astfel, ionii de Cu(II) sunt în geometrii tetraedrice distorsionate; ionul de Zn(II) în geometria sa cea mai caracteristică, tetraedrică, iar cel de Ni(II) în geometrie octaedrică.

Un alt complex binuclear de Ni(II), (**173**), $K_2Ni_2(AAZ)_3 \cdot 5\ H_2O$ a fost preparat din HAAZ, $NiCl_2$ şi KOH, în metanol, la rapoarte molare ale reactanţilor de 3:1:6 [267] (diferite de cele în care a fost preparat compusul **172** [104b]. În acest complex, Ni(II) este de asemenea în înconjurare octaedrică, fapt demonstrat din determinările de susceptibilitate magnetică ale complexului, în timp ce acetazolamida se pare că este dublu deprotonată, atât la gruparea sulfonamidică, cât şi la cea acetamidică. Deşi nu s-a stabilit o structură definitivă a acestui

Scanned with OKEN Scanner

complex, se pare că ligandul interacţionează cu ionii metalici într-o manieră similară cu cea descrisă pentru compuşii **168-172**, iar gruparea sa acetamidică formează săruri cu excesul de bază.

Alţi complecşi ai acetazolamidei au fost cei cu Cd(II); Hg(II) şi Ag(II) [267]. Complecşii de Hg(II) (**175**) şi Cd(II) (**174**), [Cd(AAZ) · 3/2 H_2O], [Hg(AAZ).1/2 H_2O] au fost preparaţi la temperatura camerei în soluţii alcoolice (MeOH sau MeOH - *i*-PrOH), în prezenţa unor baze tari (precum Bu_4NOH sau KOH). Complexul **176**, [Ag_2(AAZ)] a fost preparat similar, în metanol, fără bază lucrându-se la raport molar HAAZ: Ag^+ de 1:3. Modificarea rapoartelor molare ale reactanţilor (la 1:1), în prezenţa amoniacului, a generat compusul **177** [Ag_2(AAZ)(NH_3)]. Complecşii **174-177**, au fost caracterizaţi prin procedee standard (analitice, spectrale, magnetice, termogravimetrice etc), dar nu s-au propus structuri ale lor [267].

Recent, au fost raportaţi complecşii acetazolamidei cu alţi cationi divalenţi, din grupele principale: Be(II); Mg(II) şi Pb(II). Compuşii **178** [Be(AAZ)$_2$]; **179** [Mg(AAZ)$_2$(H_2O)$_2$] şi **180** [Pb(AAZ)$_2$(H_2O)$_2$] au fost preparaţi similar cu derivaţii **169-172**, din sarea de sodiu a sulfonamidei şi perclorații metalelor respective, în alcool-apă, la reflux [272]. Modul de coordinare al ligandului este similar cu cel prezentat la complecşii amintiţi mai sus, iar ionii metalici prezintă o geometrie: tetraedrică pentru Be(II) şi octaedrică pentru Mg(II) şi Pb(II). La ultimii doi compuşi poziţiile de coordinare axiale sunt ocupate de două molecule de apă [272].

În studiul complecşilor acetazolamidei au fost incluşi şi ionii metalelor trivalente, datorită importanţei fiziologice a unora dintre ei, şi aplicaţiilor lor în domeniul medical (compuşii de aluminiu în antacide [278], cei de Fe(III) în diverse proteine etc.).

Complecşi de tipul [M(AAZ)$_3$ · H_2O] au fost preparaţi atât pentru ionii trivalenţi din grupările principale (Al(III); Ga(III); In(III); Tl(III)) şi secundare (Fe(III); Ru(III); Rh(III) şi Au(III)) cât şi pentru întreaga serie de lantanide [271, 273-276] (tabelul 40). În tabelul 40 sunt prezentate activităţile biologice ale acestor complecşi asupra AC II (deşi o parte au fost de asemenea testaţi şi pe izozima AC I).

Tabelul 40

Complecşi ai acetazolamidei (HAAZ) reportaţi şi datele lor de inhibiţie (IC_{50}) asupra izozimei bovine AC II.

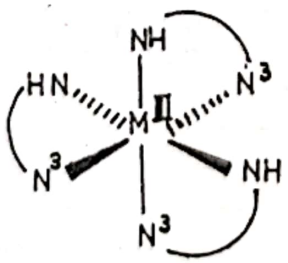
Nr.	Inhibitor	$IC_{50}*10^{-8}$ (M) [a]	Ref. [b]
	HAAZ (acetazolamida)	1	–
165	[Co(AAZ)$_2$(NH_3)$_2$]	4	265, 270
166	[Zn(AAZ)$_2$(NH_3)$_2$]	2	265, 270
167	[Ni(AAZ)$_2$(NH_3)$_2$]	5	266, 270
168	[Cu(AAZ)(NH_3)$_2$(OH_2)]$_2$ · 2 H_2O	7	268, 270
169	[Cu(AAZ)$_2$]	1	104
170	[Cu(AAZ)Cl]$_2$	4	104
171	[Zn(AAZ)$_2$]	9	104
172	[Ni(AAZ)(OH)(OH_2)$_2$. 6 H_2O	3	104

Scanned with OKEN Scanner

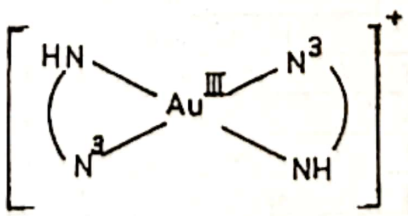
173	$K_2Ni_2(AAZ)_3 \cdot 5\ H_2O$	0,7	267
174	$Cd(AAZ) \cdot 3/2\ H_2O$	0,7	267, 270
175	$Hg(AAZ) \cdot 1/2\ H_2O$	0,2	267, 270
176	$[Ag_2(AAZ)]$	0,3	267, 270
177	$[Ag_2(AAZ)(NH_3)]$	0,4	267, 270
178	$[Be(AAZ)_2]$	0,8	272
179	$[Mg(AAZ)_2(OH_2)_2]$	0,5	272
180	$[Pb(AAZ)_2(OH_2)_2]$	0,1	272
181	$[Al(AAZ)_3] \cdot 8\ H_2O$	0,08	276
182	$[Ga(AAZ)_3] \cdot 8\ H_2O$	0,06	276
183	$[In(AAZ)_3] \cdot 8\ H_2O$	0.07	276
184	$[Tl(AAZ)_3] \cdot 8\ H_2O$	0,03	276
185	$[Fe(AAZ)_3] \cdot 8\ H_2O$	0,03	275
186	$[Ru(AAZ)_3]$	0,20	274
187	$[Rh(AAZ)_3]$	0,02	274
188	$[Au(AAZ)_3]Cl$	0,03	274
189	$La(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0.01	271
190	$Ce(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,01	271
191	$Pr(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,006	271
192	$Nd(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,004	271
193	$Sm(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,002	271
194	$Eu(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,001	271
195	$Gd(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,002	271
196	$Tb(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,001	271
197	$Dy(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,002	271
198	$Ho(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,001	271
199	$Er(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,001	271
200	$Tm(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,001	271
201	$Yb(AAZ)_3 \cdot 8\ H_2O$	0,001	271
202	$[VO(AAZ)_2]$	0,6	273
203	$Ce(AAZ)_4 \cdot 6\ H_2O$	0,015	273
204	$Th(AAZ)_4 \cdot 4\ H_2O$	0,013	273
205	$UO_2(AAZ)_2 \cdot 3\ H_2O$	0,009	273

[a] Determinate prin metoda Maren şi tehnica SEI [201].
[b] Referinţa în care este descrisă sinteza şi testarea inhibitorilor.

Pe baza datelor spectroscopice şi magnetice compuşii de tipul **181-187** au o geometrie octaedrică a ionului metalic [274-276], pe când derivatul de Au(III) **188**, este plan-pătratic [274].



181 – 187



188

Determinarea geometriei ionului metalic din ceilalţi derivaţi de acetazolamidă este oarecum mai dificilă, deoarece atât lantanidele, cât şi alţi

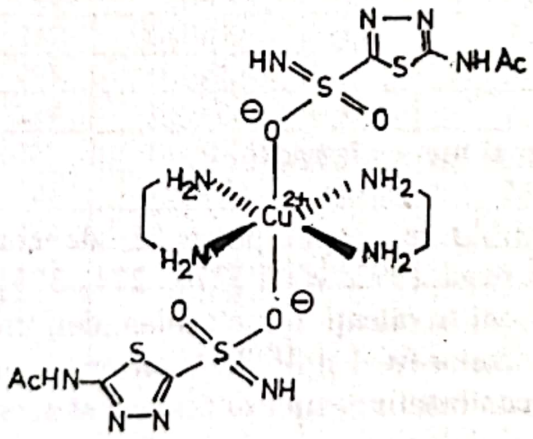
Scanned with OKEN Scanner

cationi precum Ce(IV); Th(IV) etc., au preferinţe stereochimice pentru cifre de coordinare peste 6. Astfel, este foarte probabil ca apa prezentă în astfel de complecşi, face parte din sfera de coordinare a ionului metalic. Geometriile ionilor centrali au fost stabilite prin metode spectroscopice şi magnetice: derivatul **202** de V(IV) este în înconjurarea de piramidă pătratică, pe când cel de U(VI) de bipiramidă pentagonală [273]. Şi în aceşti derivaţi, **181-205**, acetazolamida acţionează ca ligand bidentat, în stare anionică, prin atomii de azot sulfonamidic şi endociclic N^3 [271-276].

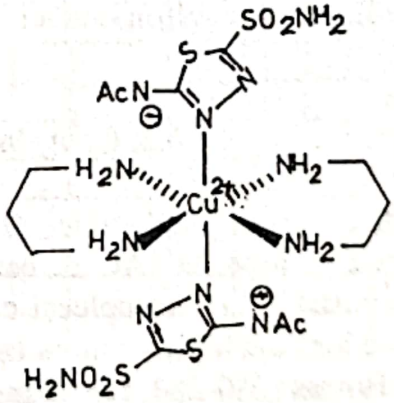
Din datele tabelului 40, care reproduce proprietăţile de inhibiţie pentru izozima AC II (bovină ale compuşilor **165-205**, se observă că cu puţine excepţii, complecşii acetazolamidei sunt inhibitori mai eficienţi decât sulfonamida de la care derivă. Explicaţia unei asemenea intensităţi de inhibiţie se află în mecanismul de acţiune al acestora la nivel molecular [173] (secţiunea 4.3.). Cationii care au condus la derivaţi deosebit de eficace ca IAC sunt: Hg(II), Ag(I), Pb(II); precum şi toţi cationii trivalenţi, cu o menţiune specială asupra lantanidelor trivalente, precum şi a Ce(IV), Th(IV), U(VI).

În plus, compuşii conţinând Mg(II) sau/şi Al(III) – cationi prezenţi în toate antacidele utilizate în tratamentul ulcerelor gastroduodenale [278] – ar putea conduce la dezvoltarea de medicamente antiulceroase cu acţiune dublă, atât ca inhibitori ai secreţiei de HCl prin inhibarea AC, cât şi prin neutralizarea HCl format de către cationul respectiv.

Recent, grupul lui Borras [269] a raportat complecşii de Cu(II) ai acetazolamidei, conţinând ca liganzi etilendiamina (**206**) şi 1,3-propilendiamina (**207**). Structura acestor compuşi a fost determinată prin cristalografie de raze X şi este redată mai jos:



206

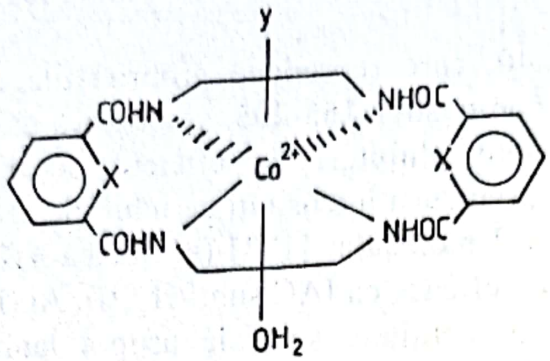


207

Prin sinteza compusului **206**, cu etilendiamina, pentru prima oară s-a evidenţiat complexarea unei sulfonamide printr-un atom de oxigen al grupării SO_2. Şi în acest caz ligandul acţionează în stare deprotonată, dar probabil că la gruparea sulfonamidică şi nu la cea acetamidică, cum afirmă descoperitorii compusului [269]. În cazul în care deprotonarea decurge la gruparea SO_2NH_2, acest complex derivă de la o structură tautomeră cu legături S=NH (vezi structura **206**). Deşi

Scanned with OKEN Scanner

diferențele structurale dintre cele două amine care sunt liganzi în complecşii **206** şi **207** sunt minime, structura derivatului de propilendiamină diferă marcant de cea a complexului **206**. În **207** acetazolamida se comportă de asemenea ca ligand monodentat, acționând în stare deprotonată (la gruparea acetamidică în acest caz), dar interacțiunea cu ionul de Cu(II) se realizează prin atomul de azot N^4, ca şi în complexul de Ni(II) **167**, raportat anterior de acelaşi grup [266].



208 X = CH, N
a y = H_2O
b y = RSO_2NH (AAZ, EZA etc.)

Au fost preparați complecşii de Co(II) ai liganzilor macrociclici [277] (printre care şi acetazolamida) prin condensarea etilendiaminei cu acid piridin-2,6-dicarboxilic, şi respectiv cu acid izoftalic (de tipul **208a**) cu sulfonamide heterociclice. În compuşii obținuți, de tipul **208b**, acetazolamida acționează ca ligand monodentat, prin intermediul atomului de azot sulfonamidic (în stare ionizată). Legarea este similară cu cea a ionului metalic din enzima nativă sau substituită cu Co(II) [277]. Aceşti compuşi pot fi considerați că mimează interacția enzimei cu inhibitorii sulfonamidici.

6.2. Complecşi ai metazolamidei

Investigarea metazolamidei (HMZA) în scopul preparării de combinații complexe cu acțiune de IAC datează după 1992, când [270, 274, 379] grupul nostru a raportat primii complecşi cu ioni trivalenți ai metazolamidei, precum şi proprietățile lor de inhibiție asupra izozimelor AC I şi AC II. Ulterior la scurt timp, grupul lui Borras [280-282] a preparat combinații complexe conținând acest ligand şi amine (precum piridina, amoniac, liganzi de tip „amino-iminic").

Din punctul de vedere al chimiei coordinative, comportarea metazolamidei este mult mai simplă decât a acetazolamidei, pe de o parte datorită faptului că prin metilare atomul de azot N^4, acesta nu mai poate participa la interacțiuni cu ioni metalici, iar pe de altă parte datorită prezenței unui singur proton acid, la gruparea sulfonamidică, care nu mai generează probleme referitoare la determinarea grupării deprotonate în combinații complexe, ca în cazul acetazolamidei. Deşi există asemănări structurale foarte mari, între cei doi liganzi, chimia coordinativă a metazolamidei este mai apropiată celei a etoxzolamidei (HEZA). Totuşi, frecvent,

Scanned with OKEN Scanner

HMZA, se comportă ca ligand bidentat, interacționând în forma deprotonată, prin intermediul atomului de azot sulfonamidic și endociclic N^3 cu ionii metalici [270, 274, 279]. Prezența acestor complecși nu exclude posibilitatea sintezei de complecși în care metazolamida se comportă ca ligand monodentat, interacționând cu ionii metalici prin intermediul grupării sulfonamidice deprotonate (prin atomul de azot) [280-282].

Un mare număr de complecși ai metazolamidei cu cationi trivalenți (precum Al(III); Ln(III); Ru(III); Rh(III); Au(III) au fost preparați și testați ca IAC datorită eficacității deosebite ca inhibitori enzimatici (secțiunea 6.1., tabelul 40) a complecșilor de acetazolamidă corespunzători. În acești compuși (tabelul 41) metazolamida acționează ca ligand bidentat, prin atomul de azot (ionizat) al grupării sulfonamidice, și prin atomul endociclic N^3. Această comportare a fost diagnosticată pe baza datelor spectroscopice (de tipul celor menționate la discuția complecșilor de acetazolamidă, secțiunea 6.1.) [270, 274, 279].

Tabelul 41

Complecși ai metazolamidei (HMZA) și date de inhibiție asupra izozimelor AC I și AC II

Nr.	Compus	IC_{50} (M)		Ref. [c]
		AC I [a] ($\cdot 10^{-7}$)	AC II [b] ($\cdot 10^{-8}$)	
	HMZA (metazolamidă)	9,4	2	279
209	$La(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	4,8	0,75	279
210	$Ce(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	4,9	0,57	279
211	$Pr(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	4,1	0,64	279
212	$Nd(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	5,3	0,09	279
213	$Sm(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	4,7	0,15	279
214	$Eu(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	4,0	0,08	279
215	$Gd(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	3,7	0,13	279
216	$Tb(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	3,3	0,10	279
217	$Dy(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	2,5	0,08	279
218	$Ho(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	3,6	0,08	279
219	$Er(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	2,0	0,09	279
220	$Tm(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	2,2	0,07	279
221	$Yb(MZA)_3 \cdot 8H_2O$	2,0	0,07	279
222	$[Al(MZA)_3] \cdot 8H_2O$	–	0,09	270
223	$[Ru(MZA)_3]$	1,7	0,54	274
224	$[Rh(MZA)_3]$	5,3	0,18	274
225	$[Au(MZA)_2]Cl$	0,4	0,18	274

[a] Izozima umană; [b]Izozima bovină; [c] Ref. în care este descrisă prepararea și testarea inhibitorilor.

Geometriile ionilor metalici în complecșii de metazolamidă sunt probabil similare celor ale complecșilor corespunzători de acetazolamidă.

– lantanidele au probabil cifre de coordinare peste 6, apa – așa cum s-a evidențiat și prin studii termo-gravimetrice – fiind ligand [279];

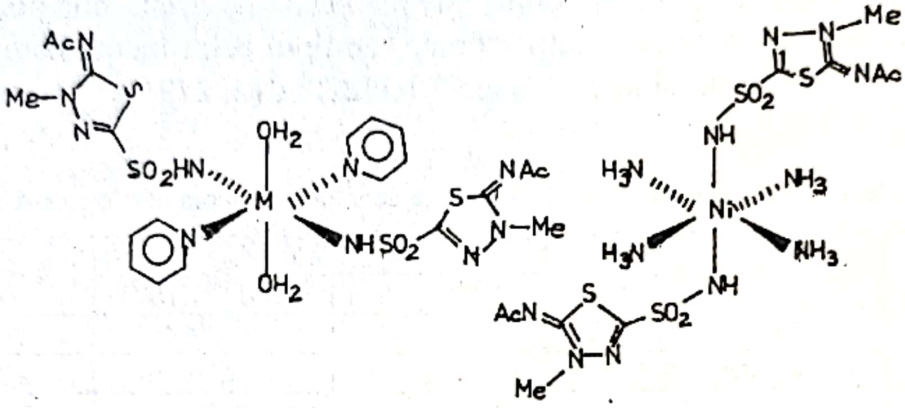
– Al(III); Ru(III) și Rh(III) au geometrii octaedrice, structura complecșilor fiind de tipul **181-187**;

– complexul de Au(III) (singurul electrolit 1:1 dintre compușii investigați) este plan-pătrat, cu o structură de tipul **188** (secțiunea 4.1.).

Scanned with OKEN Scanner

Toți acești complecși au fost preparați în alcool-apă, la reflux, timp de câteva ore din sarea de sodiu a sulfonamidei și o soluție alcoolică/apoasă de sare metalică. În general s-a utilizat percloratul ca sare metalică pentru sinteza compușilor **209-222** și clorura pentru cei de tipul **274-279**.

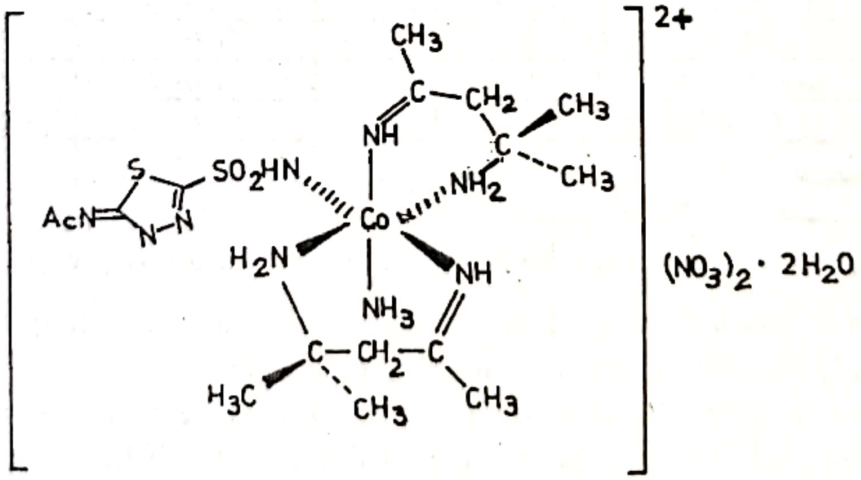
Alzuet și colab. [280, 281] au raportat sinteza și structura tridimensională (determinată prin cristalografie de raze X) pentru complecșii **226-229**, conținând în afara metazolamidei (ca anion) și piridină sau amoniac. Complecșii sunt octaedrici (**226**, **227** și **229**) sau octaedrici distorsionați (derivatul de Cu(II) **228**), iar coordinarea metazolamidei se realizează prin atomul de azot sulfonamidic. Compușii au fost preparați în soluții etanolice sau piridinice, în exces de HMZA și amină.



226 : M = Co(II)
227 : M = Ni(II)
228 : M = Cu(II)

229

Complexul de Co(III) **230**, recent raportat de același grup [282], a fost preparat prin reacția $Co(NO_3)_2$ cu metazolamidă, amoniac și acetonă. Compusul conține două molecule de 2-metil-2-amino-4-imino-pentan ca liganzi, obținut *in situ* prin condensarea crotonică a acetonei, adiția unei molecule de NH_3 la legătura C=C formată și condensarea grupării cetonice cu altă moleculă de amoniac.



230

Ionul de Co(II) a fost oxidat la Co(III) sub influența O_2 din aer, și are o geometrie octaedrică, patru poziții de coordinare fiind ocupate de atomii de azot ai

ligandului de tip „amino-imino", una de o moleculă de amoniac (în poziție axială), iar ultima de atomul de azot sulfonamidic (ionizat) al unei molecule de metazolamidă. Deprotonarea sulfonamidei se realizează sub influența excesului de amoniac utilizat în sinteză. Spre deosebire de complecşii discutați anterior (tabelul 41) compuşii de tipul **226-230** nu au fost investigați pentru inhibiția AC.

După cum se observă din datele tabelului 41, inhibitorii complecşi **209-225**, sunt fără excepție mai eficienți în a inhiba ambele izozime (AC I şi AC II) în comparație cu sulfonamida de la care au fost obținuți. Pentru derivații de lantanide se observă o creştere a eficienței inhibitorului (pentru ambele izozime) odată cu creşterea greutății ionului metalic, un fapt corelat cu variația constantelor de stabilitate a acestor complecşi în sensul invers. Efectul a fost observat de altfel şi pentru complecşii Ln(II) cu acetazolamida şi etoxzolamida [270, 271, 279].

6.3. Complecşi ai etoxzolamidei

Compuşi coordinativi ai etoxzolamidei cu proprietăți de inhibiție a AC au fost raportați doar de grupul nostru [104, 270, 272-276, 279, 283, 284].

Chimia coordinativă a acestui ligand este apropiată celei a metazolamidei, şi într-o oarecare măsură cu a acetazolamidei. Astfel în majoritatea complecşilor raportați, ligandul acționează în forma deprotonată, sistemul donor fiind constituit de atomul de azot sulfonamidic (NH^-) şi atomul de azot endociclic N^3. Sunt însă cunoscute şi combinații complexe în care atomul donor endociclic este sulful [283]. Etoxzolamida poate acționa şi ca ligand neutru întrucât nu este deprotonată la gruparea sulfonamidică [283].

Tabelul 42

Complecşi ai etoxzolamidei (HEZA) şi date de inhibiție asupra izozimei AC II bovine

Nr.	Compus	IC_{50} (nM)	Ref.[a]
	HEZA (etoxzolamida)	1	270
231	$[Zn(EZA)_2]$	0,9	104
232	$[Cu(EZA)_2(OH_2)_2]$	0,8	104
233	$[Ni(EZA)(OH)(OH_2)]_2 \cdot 6H_2O$	7,5	283
234	$[Pd(HEZA)Cl_2]$	0,8	283
235	$[Pt(EZA)Cl]_2$	3	283
236	$[Be(EZA)_2]$	0,9	272
237	$[Mg(EZA)_2(OH_2)_2]$	0,7	272
238	$[Pb(EZA)_2(OH_2)_2]$	0,2	272
239	$La(EZA)_3 \cdot 12H_2O$	0,1	284
240	$Ce(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,6	284
241	$Pr(EZA)_3 \cdot 12H_2O$	0,08	284
242	$Nd(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,1	279
243	$Sm(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,07	279
244	$Eu(EZA)_3 \cdot 12H_2O$	0.08	279
245	$Gd(EZA)_3 \cdot 12H_2O$	0,07	279
246	$Tb(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,06	279

Scanned with OKEN Scanner

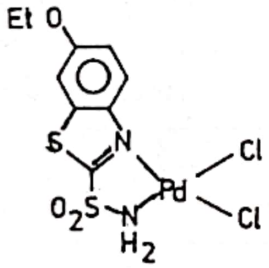
247	$Dy(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,04	279
248	$Ho(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,04	279
249	$Er(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,04	284
250	$Tm(EZA)_3 \cdot 12H_2O$	0,05	279
251	$Yb(EZA)_3 \cdot 12H_2O$	0,05	279
252	$[Al(EZA)_3 \cdot 8H_2O$	0,3	276
253	$[Ga(EZA)_3] \cdot 8H_2O$	0,2	276
254	$[In(EZA)_3] \cdot 8H_2O$	0,2	276
255	$[Tl(EZA)_3] \cdot 8H_2O$	0,1	276
256	$[Fe(EZA)_3] \cdot 6H_2O$	0,8	275
257	$[Ru(EZA)_3]$	0,04	274
258	$[Rh(EZA)_3]$	0,02	274
259	$[Au(EZA)_2]Cl$	0,01	274
260	$[VO(EZA)_2]$	0,95	273
261	$Ce(EZA)_4 \cdot 6H_2O$	0,18	273
262	$Th(EZA)_4 . 4H_2O$	0,01	273
263	$[UO_2(EZA)_2(OH_2)] \cdot 2H_2O$	0,01	273

[a] Referința în care este descrisă prepararea și testarea inhibitorilor.

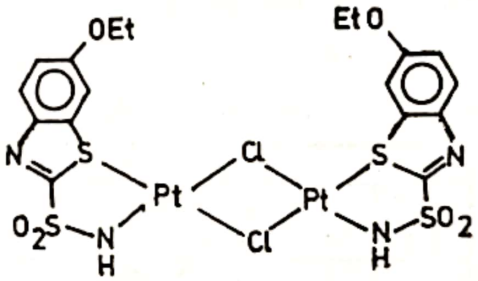
Sistemul donor al ligandului și geometria ionului metalic pentru complecșii de Zn(II) **231**, și Ni(II) **233**, (tabelul 42) sunt similari celor ai complecșilor corespunzători ai acetazolamidei [106,283].

Complexul de Cu(II) **232** al etoxzolamidei este octaedric conținând două molecule de apă coordinate, elemente distinctive față de complexul similar de acetazolamidă (**169**) care este pseudotetraedric [104].

Cu totul diferiți sunt însă complecșii de Pd(II) și Pt(II), **234** și **235**, a căror structură este redată mai jos:



234



235

După cum s-a determinat din datele fizico-chimice [283], în complexul de Pd(II) extoxzolamida apare ca ligand neutru, coordinând ionul de Pd(II) (aflat în geometria sa predilectă, plan-pătratică) prin atomul de azot sulfonamidic neionizat și azotul endociclic N^3. Complexul de Pt(II) **235**, cu geometria de asemenea, plan-pătratică, este dinuclear; coordinarea Pt(II) realizându-se prin azotul sulfonamidic ionizat, atomul S^1 și două punți de clorură.

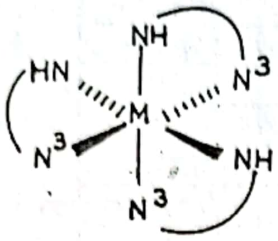
Complecșii **234** și **235** sunt singurele exemple de coordinare „exotică" a etoxzolamidei; în restul combinațiilor, aceasta acționează mereu după schema clasică, adică prin atomul de azot sulfonamidic ionizat și cel endociclic N^3.

Complecșii de Be(II), Mg(II), Pb(II), Ln(III), Fe(III), Ru(III), Rh(III), Au(III) și cationii trivalenți din grupele principale, (tabelul 42) sunt similari sub aspectul

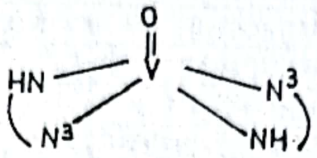
Scanned with OKEN Scanner

coordinării şi geometriei cationului) cu complecşii corespunzători ai acetazolamidei (tabelul 40; secţiunea 6.1.).

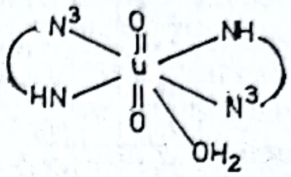
Geometriile ionilor centrali pentru unii dintre aceşti complecşi sunt redate mai jos:



252 258



260



263

Cu excepţia complecşilor de Pd(II) şi Pt(II) aceşti compuşi au fost sintetizaţi din sarea de sodiu a etoxzolamidei şi clorurile sau percloraţii cationilor respectivi, în alcool la reflux. Derivaţi de Pd(II) şi Pt(II), au fost preparaţi din Na_2MCl_4 (M = Pd; Pt) şi o soluţie alcoolică de HEZA, în condiţii de pH riguros controlat (la pH 7) [283].

Activitatea de inhibiţie a izozimei AC II a complecşilor etoxzolamidei este redată în tabelul 42. Cu excepţia complecşilor dinucleari de Ni(II) şi Pt(II), toţi compuşii preparaţi sunt IAC mai eficienţi decât etoxzolamida, ea însăşi un inhibitor foarte puternic [16]. Activităţi inhibitorii deosebite asupra AC au avut, din nou, derivaţii lantanidelor, cei de Au(III), Th(IV) şi U(VI). Aceste date pot fi situate într-un paralelism avansat cu cele ale complecşilor de acetazolamidă şi metazolamidă analizaţi anterior.

6.4. Complecşi ai zaharinei

Deşi zaharina a fost raportată recent ca IAC cu un efect slab [194], unele combinaţii complexe ale ei – analizate în această secţiune – se dovedesc a fi mult mai eficiente din punctul de vedere al inhibiţiei enzimatice. Această intensificare a acţiunii inhibitorii se explică prin mecanismul lor dual de acţiune, atât prin anioni cât şi prin cationi, şi prin interferenţa cu ambele etape ale mecanismului catalitic al enzimei [104, 173a, 270] (secţiunea 6.3.).

Spre deosebire de celelalte sulfonamide utilizate pentru prepararea de combinaţii complexe, zaharina este un ligand monodentat, coordinând aproape întotdeauna ionii metalici prin atomul de azot (în stare ionizată). De asemenea, dintre toţi liganzii menţionaţi, zaharina este acidul cel mai puternic (pK_a 1,30) [285]. În sintezele compuşilor descrişi mai jos a fost întotdeauna utilizată sarea de sodiu a zaharinei (NaSAC). Determinarea prin difracţie a razelor X, a permis a se rezolva structura tridimensională pentru complexul de Cu(II) al zaharinei **264** [286]. Complexul este octaedric, cele patru molecule de apă ocupând poziţiile de coordinare ecuatoriale, iar ligandul organic, pe cele axiale (în *trans*), legarea realizându-se prin atomul de azot ionizat al ciclului izotiazolic.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 43

Complecşi ai zaharinei (HSAC) şi activitatea lor de inhibiţie asupra izozimei AC II bovine

Nr.	Compus	IC_{50} (μM)	Ref.[a]
	NaSAC (zaharină sodică)	90	194,270
264	$[Cu(SAC)_2(OH_2)_4] \cdot 2H_2O$	0,6	270,286
265	$[Zn(SAC)_2(OH_2)_2]$	0,2	270,286
266	$[Be(SAC)_2(OH_2)_2]$	8,4	272
267	$[Ni(SAC)_2(OH_2)_2] \cdot 4H_2O$	7,6	272,286
268	$[Mg(SAC)_2(OH_2)_4] \cdot 2H_2O$	5,7	272
269	$[Co(SAC)_2(OH_2)_4] \cdot 2H_2O$	4,9	272
270	$[Cd(SAC)_2(OH_2)_2]$	0,9	272
271	$[Hg(SAC)_2(OH_2)_2]$	0,1	272
272	$[Pb(SAC)_2(OH_2)_2] \cdot 6H_2O$	0,2	272
273	$[Hg_2(SAC)_2]_n$	3,8	272
274	$[Fe(SAC)_3(OH_2)_3] \cdot 2H_2O$	0,6	275
275	$[VO(SAC)_2(OH_2)_2]$	1,3	273
276	$[Ce(SAC)_4] \cdot 8H_2O$	0,86	273
277	$Th(SAC)_4 \cdot 6H_2O$	0,92	273
278	$[UO_2(SAC)_2(OH_2)_3]$	0,08	273

[a] Vezi tabelul 42.

În complecşii cu acest ligand (tabelul 43) recent raportaţi de noi [270, 272-275], coordinarea se realizează aproape fără excepţie în acest mod. De menţionat că în cazul unui singur compus, **273** (care este un polimer după toate probabilităţile) [272] s-au observat modificări majore ale vibraţiilor C=O şi SO_2 în spectrul IR, comparativ cu aceleaşi vibraţii în ligandul liber sau în alţi complecşi ai zaharinei. Acestea au fost interpretate, ca datorându-se participării acestor grupări în interacţiile cu ionul mercuros [272]. Geometriile ionilor centrali din aceşti complecşi sunt:

a) octaedrice, pentru derivaţii de Cu(II), Co(II), Mg(II), Fe(III);

b) tetraedrice (eventual distorsionate), în cazul derivaţilor de Zn(II), Be(II), Ni(II), Cd(II), Hg(II) şi Pb(II);

c) de piramidă pătrată pentru derivatul de oxovanadiu;

d) de bipiramidă pentagonală pentru cel de uranil.

În general se poate afirma că există o similitudine între geometriile acestor compuşi cu cele ale celorlalte sulfonamide prezentate anterior (secţiunile 6.1.-6.3.).

Efectul de inhibiţie al complecşilor este din nou mult mai important comparativ cu cel al zaharinei (tabelul 43). Astfel, derivatul de dioxouraniu **278** (inhibitorul cel mai puternic din această serie) este de peste 1000 de ori mai activ decât zaharina. Inhibiţii deosebite s-au observat şi pentru alţi complecşi ai zaharinei. În general, aceeaşi cationi care au indus o bună activitate IAC complecşilor cu sulfonamide heterociclice (HAAZ; HMZA; HEZA), au condus şi în cazul zaharinei la complecşi cu activitatea cea mai bună ca inhibitori duali.

Scanned with OKEN Scanner

6.5. Complecşi cu alte sulfonamide

Un număr restrâns de alte sulfonamide au fost utilizate pentru prepararea de combinaţii complexe cu proprietăţi de inhibitori ai AC, şi anume derivaţii de 1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamidă HCTS; HTTS şi HL^+, precum şi tosilhidrazida (ultimul este un IAC cu grupareá sulfonamidică modificată (secţiunea 5.3.)) [270,275,287-289]. Includerea compuşilor de acest tip în studiul combinaţiilor complexe s-a făcut datorită faptului că sulfonamidele cationice $H(L^+)$ şi HCTS, care sunt inhibitori slabi ai AC (secţiunea 5.4.2), în scopul de a determina efectul cationului metalic şi respectiv al grupării sulfonamidice asupra potenţei inhibitorului dual [270]. Pentru derivatul cu gruparea tioureido (HTTS) şi respectiv tosilhidrazida (TSH), motivaţia includerii în studiul formării de complecşi este că aceşti derivaţi posedă sisteme donoare diferite de ale celorlalţi liganzi investigaţi [287-289]

Complecşii preparaţi utilizând astfel de liganzi sunt prezentaţi în tabelul 44.

Tabelul 44

Complecşi cu alţi liganzi sulfonamidici şi datele de inhibiţie asupra izozimei AC II bovine (structura sulfonamidelor $H(L^+)$; HCTS, şi a tosilhidrazidei, TSH, sunt redate în introducerea acestui capitol).

Nr.	Compus	IC_{50} (M)	Ref.[a]
	$H(L^+)$ (metilsulfat)	10^{-4}	270
279	$[Cu(L^+)_2](MeOSO_3)_2$	9×10^{-7}	270
	HCTS (perclorat)	$8,6\times10^{-5}$	275
280	$[Fe(CTS)_3](ClO_4)_3$	7×10^{-7}	275
	HTTS	7×10^{-9}	186
281	$[Ni(TTS)(OH)(OH_2)]_2$	1×10^{-9}	287
	TSH	53×10^{-6}	288
282	$[Cu(TSH)_2(AcO)_2]_n$	21×10^{-6}	288
283	$[Cu(TSH)_4(AcO)_2]$	3×10^{-6}	288
284	$[Ni(TSH)_2(AcO)_2]_n$	18×10^{-6}	289
285	$[Ni(TSH)_4(AcO)_2]$	79×10^{-6}	289
286	$[Pd(TSH)_2Cl_2]$	$0,7\times10^{-6}$	289

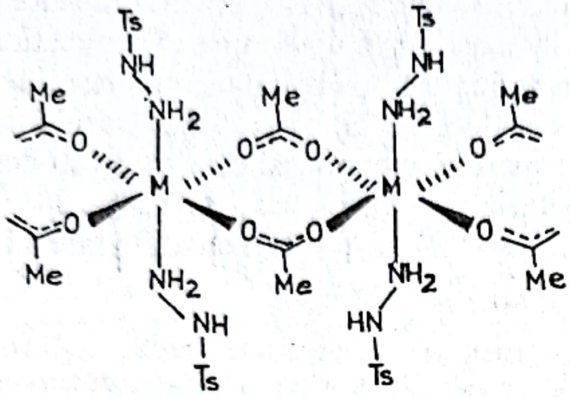
[a] Vezi tabelul 42.

Sistemele donoare ale liganzilor derivaţi de tiadiazol-2-sulfonamidă (care acţionează în forma deprotonată la gruparea sulfonamidică - complecşii **279-281**) constau din atomul de azot sulfonamidic (ionizat) şi azotul endociclic N^3. Acestea sunt deci, similare sistemelor donoare ale metazolamidei şi etoxzolamidei (secţiunile 6.2 şi 6.3). Sub aspectul geometriilor, datele spectroscopice şi magnetice atribuie o conformaţie pseudotetraedrică complexului de Cu(II) **279**; octaedrică celui de Fe(III), **280**, în timp ce derivatul de Ni(II) **281**, este binuclear şi foarte similar complecşilor corespunzători ai acetazolamidei şi etoxzolamidei (tipul **172** – secţiunea 6.1.). Acesta este primul complex caracterizat al acestei sulfonamide, actualmente fiind în studiu derivaţi cu mulţi alţi cationi.

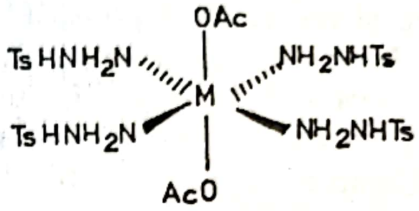
Tosilhidrazida are la complexare o comportare complet diferită faţă de a celorlalţi liganzi investigaţi. Astfel, în complecşii **282-286**, TSH este ligand monodentat şi

Scanned with OKEN Scanner

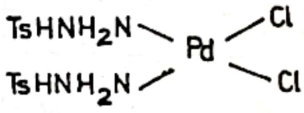
neutru, interacționând întotdeauna cu cationii prin intermediul atomului de azot terminal, N^2 – și nu prin atomul de azot „sulfonamidic", cum se leagă de ionul de Zn(II) din enzima nativă, sau de ionul de Co(II) din CoAC II (secțiunea 5.3). Acești complecși au fost preparați în soluții metanolice, fără a se adăuga baze (în scopul formării sărurilor, cum s-a procedat la prepararea altor complecși descriși aici [287,288]. Structura propusă pentru unii derivați de acest tip este redată mai jos.



282 : M = Cu (II)
284 : M = Ni (II)



283 : M = Cu (II)
284 : M = Ni (II)



286

Derivații de Cu(II) și Ni(II) ai tosilhidrazidei sunt octaedrici (după cum s-a determinat din date spectrale și magnetice), polinucleari (**282**, **284**) și respectiv mononucleari (**283**, **285**). În primii compuși, TSH ocupă pozițiile axiale, pe când în ultimii, cele patru poziții ecuatoriale. Ca o particularitate de semnalat este că anionii acetat fac parte din sfera de coordinare, ca liganzi în punte, în primii complecși, și respectiv ca liganzi monodentați, în ultimii.

Complexul de Pd(II) **286**, este plan-pătratic, cu doi ioni clorură în *cis* și două molecule de TSH coordinate (de asemenea prin atomul N^2). Complexul **286** este oarecum similar complexului de Pd(II) al etoxzolamidei, **234**, care de asemenea conține doi ioni clorură coordinați, și o grupare H_2N; dar sulfonamidică (secțiunea 6.3.) [283].

Ceea ce este însă notabil din datele tabelului 44 este faptul că și acești complecși, unii derivând de la IAC deosebit de slabi (cum ar fi sulfonamidele $H(L^+)$; HCTS etc.) sunt inhibitori ai anhidrazei carbonice mult mai eficienți comparativ cu sulfonamida de la care derivă. Aceasta se constituie ca o caracteristică comună întregii clase de inhibitori complecși, și se explică prin mecanismele de acțiune la nivel molecular ale acestor compuși. Importanța practică și teoretică a unor astfel de inhibitori este ca alegând anumiți cationi metalici, și anumite sulfonamide IAC ca liganzi (cu o activitate dată ca IAC), se oferă posibilitatea design-ului unor inhibitori cu intensitate variabilă, de la foarte puternici la mai puțin puternici, prin variații ale celor două componente amintite mai sus, componenta sulfonamidică (ligandul) și ionul metalic.

Scanned with OKEN Scanner

7. FARMACOLOGIA INHIBITORILOR ANHIDRAZEI CARBONICE

Sulfonamidele cu proprietăţi de IAC au fost primele diuretice non-mercuriale utilizate clinic [16]. Ulterior, acetazolamida şi unii compuşi înrudiţi cu ea (metazolamida, benzolamida, etoxzolamida etc.), deşi au jucat un rol minor ca diuretice din punct de vedere clinic [16], au avut un rol fundamental pentru dezvoltarea fiziologiei şi farmacologiei renale, fiind punctul de plecare pentru importante clase de agenţi farmacologici, cum ar fi diureticele de ansă [16, 154, 20] sau cele de tip tiazidic [208]. În medicina clinică, sulfonamidele IAC au o importanţă *per se*, fiind utilizate în tratamentul a numeroase afecţiuni (tabelul 45) [17, 290]

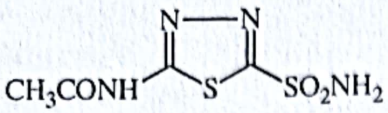
Tabelul 45

Utilizări clinice ale IAC [17]

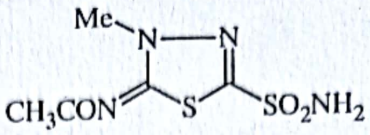
Afecţiunea	Mecanismul de acţiune	Ref.
Glaucom	Reducerea formării umorii apoase	291
Edeme	Excreţia renala de Na^+	16
Hidrocefalie	Reducerea formării fluidului cerebrospinal	292
Epilepsie	Acidoza metabolică (cu efect asupra SNC)	293
Rău de altitudine	Impunerea unui element de acidoză metabolică asupra alcalozei respiratorii	294
Apnee centrală în somn	Reducerea [HCO_3^-] plasmatice cu stimulare respiratorie	295
Boala obstructivă pulmonară	Idem	296
Paralizie periodică hipokalemică	Acidoza metabolică cu reducerea fluxului de K^+ în muşchii scheletici	297
Paralizie periodică hiperkalemică	Pierderea renală de K^+	298
Ulcere gastrice şi duodenale	Reducerea formării HCl în stomac	196
Toxicitate datorată medicamentelor acide (metaboliţilor lor)	Alcalinizarea urinei	299

În aproape cinci decenii de utilizare clinică, patru sulfonamide sistemice inhibitoare ale anhidrazei carbonice s-au impus în terapie: acetazolamida (**I**) [16], metazolamida (**II**), etoxzolamida (**III**) şi diclorofenamida (**IV**). Ultimul compus este utilizat ca diuretic de tip tiazidic, dar posedă şi importante efecte de inhibiţie a anhidridei carbonice. Recent a fost introdus în terapia clinică cel de al cincilea IAC, cu efect topic ca agent antiglaucamatos, care este dorzolamida, discutată în secţiunea 5.2.1.

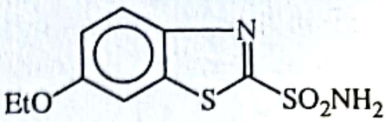
Scanned with OKEN Scanner



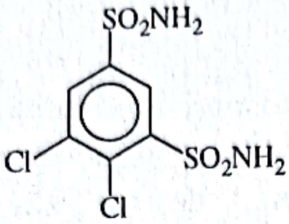
Acetazolamida (**I**)



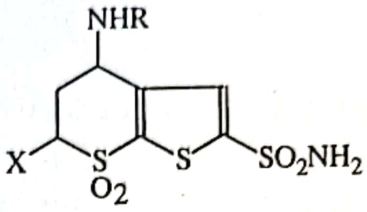
Metazolamida (**II**)



Etoxzolamida (**III**)



Diclorofenamida (**IV**)



V.a Dorzolamida (X = Me; R = Et)
V.b MK 927 (X = H; R = *i*-Bu)

7.1. Inhibitori sistemici

Deoarece aproape toate țesuturile mamiferelor conțin o cantitate mare de enzime din familia AC, pentru a obține răspunsuri fiziologice importante, și exploatabile din punct de vedere clinic, precum reducerea secrețiilor de electroliți în diferite fluide corporale (tabelul 45) este necesară o inhibiție de peste 99,9% a activității enzimei. Pentru realizarea acestui deziderat, este necesară utilizarea unor inhibitori puternici caracterizați prin K_I egal sau minor cu 10^{-8}.

Tabelul 46

Proprietăți fizico-chimice ale IAC utilizați clinic (**I–V**)

IAC	K_I[a] (nM)	pK_a	Solubilitate în apă (mM)	Coeficient de partiție		% legare de plasmă	$t_{1/2}$ în plasmă (ore)
				eter / tampon	cloroform / tampon		
Acetazolamida (I)	6	7,4	3	0,14	10^{-3}	95	4
Metazolamida (II)	8	7,2	5	0,62	0,06	55	8
Etoxzolamida (III)	1	8,1	0,04	140	25	96	6
Diclorofenamida (IV)	18	8,3	–	11	0,017	–	2
Dorzolamida (Vb)	4	8,3	60 [b]	–	2 [b]	–	–

[a] Pentru AC II umană, la hidratarea CO_2; [b] La pH 5 (ref. [300]).

În tabelul 46 sunt redate câteva dintre proprietățile fizico-chimice ale IAC utilizați în clinică, relevante din punct de vedere farmacologic ca: solubilitate în apă, coeficienți de partiție eter/tampon pH 7,4, respectiv cloroform/tampon pH 7,4, procentul legării de proteinele plasmatice; timpul de înjumătățire în plasmă etc. [16, 27, 300].

Prototipul inhibitorului sistemic al enzimei anhidrază carbonică cu largi utilizări în oftalmologie, gastroenterologie, neurologie, pneumo-cardiologie (secțiunea 8) este acetazolamida (**I**).

Scanned with OKEN Scanner

În urma administrării acetazolamidei, volumul de urină creşte rapid, iar pH-ul acesteia devine alcalin (tabelul 47).

Tabelul 47

Compoziţia în electroliţi a urinei după administrarea de diuretice [290]

Diuretic	Volum (mL/min)	pH	mEq/L			
			Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-
Control	1	6	50	15	60	1
Manitol	10	6,5	90	15	110	4
Acetazolamida	3	8,2	70	60	15	120
Tiazide diuretice	3	7,4	150	25	150	25
Furosemid[a]	8	6	140	10	155	1

[a] Diuretic de ansă cu proprietăţi IAC (vezi secţiunea 8.8.).

Concentraţia ionilor de de HCO_3^-, Na^+ şi K^+ de asemenea creşte, pe când cea a ionilor de Cl^- scade. Creşterea alcalinităţii urinei este acompaniată de descreşterea excreţiei de acizi titrabili [16,290]. Acest joc electrolitic de la nivelul celulei tubulare epiteliale a nefronului, are repercusiuni şi asupra echilibrului acido-bazic şi este atribuit inhibării secreţiei ionilor de H^+ de la acest nivel, în urma administrării acetazolamidei [16]. Dereglarea cantitativă a ionilor eliminaţi urinar ca urmare a administrării acetazolamidei, are repercusiuni şi asupra compoziţiei electroliţilor din plasmă. Astfel, prin excreţia urinară a ionilor de bicarbonat şi sodiu, concentraţia de HCO_3^- din fluidul extracelular descreşte şi apare o acidoză metabolică (secţiunea 8).

Instalarea acidozei metabolice diminua însă răspunsul renal la acetazolamidă, ceea ce înseamnă că efectul diuretic al drogului este micşorat. Mecanismul acestui aspect particular nu este în întregime clarificat, dar se pare că răspunsul renal la acetazolamidă este legat în principal de cantitatea de bicarbonat filtrat [16]. Acetazolamida produce o marcantă excreţie a ionilor de K^+, atribuită secreţiei mărite din tubul distal al nefronului [290]. În administrare cronică însă nu se observă dezechilibre mari ale ionilor de K^+ în organism, spre deosebire de situaţia întâlnită în cazul altor agenţi farmacologici utilizaţi ca diuretice [16, 290].

Deoarece AC este prezentă în mai multe structuri oculare (printre care şi în procesele ciliare), iar concentraţia de bicarbonat în umoarea apoasă este mare (tabelul 48), s-a postulat încă din 1949 [11] că această enzimă joacă un rol important la nivelul receptorului analizatorului vizual.

Tabelul 48

Concentraţia bicarbonatului în umoarea apoasă la iepure, înainte şi după administrarea de acetazolamidă şi viteza formării umorii apoase în aceste condiţii [16]

Sistem experimental	$[HCO_3^-]$ (mM)		Viteza de formare [µL/min]
	camera anterioară	camera posterioară	
Control	33	41	12,1
+ acetazolamida (la ½ ore)	29	32	8,2
+ acetazolamida (la 6 ore)	25	31	

Scanned with OKEN Scanner

Enzima a fost izolată în 1959 de Wistrand [12] în uveea anterioară. Prin experiențele lui Becker [291] și Maren [16, 299, 300] s-a dovedit că inhibiția enzimei cu sulfonamide (ca de exemplu I–IV) administrate sistemic reprimă formarea de bicarbonat în procesele ciliare, astfel încât transportul ionului de Na^+ (în schimb cu bicarbonatul) va diminua fluxul de apă corespunzător. Rezultatul global este că secreția umorii apoase este diminuată, iar presiunea intraoculară micșorată (secțiunea 7.2).

Deoarece AC este prezentă și în tractul gastro-intestinal (stomac, pancreas, intestinul subțire etc.) prin inhibiția sa se obțin importante efecte farmacologice, ca de exemplu reducerea secreției de HCl la nivel gastric. Această acțiune a IAC, de inducere a reducerii aciditătii gastrice este rezultatul inhibării formării ionilor H^+ – ionilor din $CO_2 + H_2O$. Inhibitorii AC de tipul I–III (la doze suficient de mari) inhibă puternic secreția de HCl în stomac, fiind utilizați în tratamentul ulcerelor gastro-duodenale [196].

Acțiunea IAC asupra SNC (sistemul nervos central) a fost intuită din cauza apariției unor efecte secundare de tipul parestezиilor și somnolenței, la pacienții tratați cu astfel de agenți [16,196].

Woodbury a demonstrat apoi că acetazolamida inhibă apariția crizelor epileptice și descreşte rata formării fluidului cerebro-spinal. Mecanismul prin care AC intervine în astfel de situații clinice, se pare că este legat de acidoza metabolică, apărută în urma inhibării enzimei prin sulfonamidă. Inhibiția AC din substanța cerebrală, plexul coroid sau eritrocitele din SNC, pot conduce la o creştere locală a pCO_2, iar efectele observate asupra SNC s-ar putea datora acestui gaz.

Rolul fundamental al AC în organism este legat de transportul CO_2 de la nivelul țesuturilor metabolizante, la cel al pulmonilor, iar inhibiția enzimei cu agenți farmacologici de tipul I–IV poate conduce la dezechilibre ale acestui transport. Ca urmare, pot apare situații tranzitorii de creştere a presiunii parțiale a CO_2 în țesuturi, inclusiv în plasmă, cu micșorarea acesteia în alveolele pulmonare.

Acetazolamida **I**, ca și ceilalți inhibitori utilizați clinic (**II–IV**) este uşor absorbită din tractul gastrointestinal. Concentrația plasmatică maximă se atinge la două ore. Drogul este excretat nemetabolizat [16] prin urină, în acest proces fiind implicate atât secreția tubulară, cât și reabsorbția pasivă. Spre deosebire de ceilalți IAC utilizați în clinică (acetazolamida, etoxzolamida și diclorofenamida), metazolamida (**II**) este metabolizată în organism în proporție de peste 70%, la un compus neidentificat, lipsit de proprietăți IAC [16]. Datorită faptului că IAC se leagă puternic de enzimă, drogurile de acest tip se distribuie cu predilecție în țesuturile în care AC este abundentă. Astfel (tabelul 46), în timp ce acetazolamida se leagă de proteinele plasmatice în proporție de 90%, metazolamida se leagă doar în proporție de 55%. Consecința unei astfel de proprietăți este că aceleași efecte farmacologice apar la doze mult mai mici de metazolamidă comparativ cu cele de acetazolamidă [16].

Acetazolamida (**I**), ca și ceilalți IAC utilizați clinic pe cale sistematică au o toxicitate acută și cronică neașteptat de mică [16]. DL_{50} pentru șoareci a fost între

Scanned with OKEN Scanner

3000-6000 mg/kg corp, fiind cam de acelaşi ordin de mărime cu valoarea DL_{50} a NaCl. Doze unice intravenoase (iv) de 2000 mg/kg (la câine) nu au fost fatale, iar şobolani tineri au supravieţuit fără probleme administrării zilnice de 900 mg/kg de acetazolamidă, timp de 6 luni. Ca efecte nedorite ale acestor testări pe animale au apărut: o puternică acidoză metabolică, cu componenta respiratorie, diminuarea cu 10% a eliminării ionilor de Na^+ şi K^+. Aceste dereglări de tip acidotic şi electrolitic nu au avut însă efecte negative majore asupra animalelor. La om, efecte toxice importante s-au observat foarte rar cu IAC [16, 290].

Efectele secundare care apar însă la bolnavii trataţi cu IAC sunt frecvente şi neplăcute, ceea ce face ca indicele terapeutic al inhibitorilor sistemici să fie scăzut, mulţi pacienţi refuzând tratamentul cu astfel de agenţi farmacologici [16, 17, 290].

Efectele secundare ale IAC pot fi clasificate în trei tipuri, astfel:

De tip „stare generală proastă" (malaise), incluzând: greaţa, oboseala, somnolenţa, depresia, anorexia, slăbirea, pierderea în greutate şi a libidoului. Astfel de efecte adverse sunt considerate a se datora inhibării AC din SNC şi/sau acidozei metabolice apărute prin inhibarea enzimei din rinichi şi plămâni.

De tip gastro-intestinal, incluzând: epigastrologii, colici abdominale, diaree. Se pare că aceste efecte secundare sunt datorate reducerii secreţiei alcaline gastrice, ca urmare a inhibării AC din tractul gastro-intestinal şi reducerii resorbţiei fluidelor în intestinul subţire şi gros [16,245].

Ultima categorie de efecte secundare ale IAC includ: perturbări respiratorii (datorate acidozei respiratorii); [302] parestezii (datorate inhibiţiei AC din SNC (celulele gliale) şi nervii periferici) [16, 17], gust denaturat (datorită inhibării AC din papilele gustative) [303], formarea litiazei renale (datorită excreţiei reduse de citrat prin inhibarea AC din rinichi) [304], miopie tranzitorie (datorită apariţiei unor edeme retiniene) [305]. Mult mai rar pot apărea de asemenea reacţii de hipersensibilitate la sulfonamide (febră, reacţii cutanate) [290]. În ciuda acestor efecte nedorite, în clinică sunt utilizate o serie de produse farmaceutice care conţin IAC. Astfel, acetazolamida este conţinută în următoarele produse: Diamox; Ederen; Ulcosilvanil. Diamox este disponibil ca tablete conţinând 125 sau 250 mg acetazolamidă, şi capsule cu eliberare retard a drogului, de 500 mg. O doză orală zilnică, eficace este de 250–500 mg. Pentru administrarea parenterală este disponibilă sarea de sodiu a acetazolamidei (Diamox-sodiu). Când este utilizat ca diuretic, drogul se dă o dată pe zi. Ulcosilvanilul este un produs original românesc [306] utilizat cu bune rezultate în tratamentul ulcerelor gastro-duodenale, elaborat de dr. Ioan Puşcas. Ulcosilvanilul conţine 400 mg acetazolamidă (asociată cu antacide şi citrat) şi se administreaza în doze de 2-4 g/zi.

Metazolamida este disponibilă în medicamentul Neptazane, conţinând 50 mg de drog activ (în tablete). Doza uzuală zilnică este de 100–300 mg.

Etoxzolamida este disponibilă în medicamentul Daranide, prezentabil în tablete conţinând 50 mg sulfonamidă. Efectele optime de acţiune s-au obţinut la doze de 100 mg/zi.

Scanned with OKEN Scanner

7.2. Inhibitori topici

Cu toate că agenții farmacologici de tipul IAC (compușii **I-IV**) sunt deosebit de eficienți în tratamentul glaucomului și ca urmare indicați, [16, 17, 291] multiplele lor efecte secundare (secțiunea 7.1) le limitează utilizările clinice prin administrare pe cale sistematică.

Aceste efecte secundare neplăcute sunt însă absente la administrarea topică, direct în ochi a unui compus cu acțiune IAC. Regretabil este că, nici unul dintre compușii sistemici utilizați clinic (acetazolamida, metazolamida, etoxzolamida sau diclorofenamida) când sunt administrate ca suspensii, geluri sau în alte formulări topice, nu sunt eficace pe cale topică în a inhiba AC din procesele ciliare [16, 154]. A fost necesară astfel dezvoltarea unor inhibitori care să aibă efect topic. Sintezele și partea de *drug-design* ale acestor compuși sunt detaliat raportate în secțiunea 5.2.1. Dintre cele câteva mii de compuși sintetizați în acest scop, doi au fost investigați farmacologic și în studii clinice (pe animale și voluntari umani) [155, 307-309]. Structura chimică a acestor două sulfonamide investigate ca IAC (compușii **Va** și **Vb**) cu efect topic este redată la începutul secțiunii 7.

După cum se observă din datele tabelului 46 (secțiunea 7.1), derivatul de tieno-tio-piransulfonamidă MK-927, are o solubilitate în apă foarte mare (60 mM), comparativ cu alte sulfonamide IAC, datorită prezenței funcției de amină secundară în molecula sa. Datorită acestei proprietăți, pot forma săruri cu acizi minerali, solubile în apă (drogul utilizat clinic este un clorhidrat). De asemenea, MK-927 (ca și MK-507 de altfel, care are K_I = 2 nM, vezi secțiunea 5.2.1) este un inhibitor foarte puternic, având K_I = 4 nM (pentru izozima AC II) [300]. Din datele existente până acum, se pare că sulfonamidele de tipul **V** nu sunt metabolizate în ochi sau în alte țesuturi [307]. În tabelul 49 sunt redate concentrațiile de drog în diverse compartimente ale ochiului în urma administrării unei picături soluție 2% MK-927 (cu pH 4,5) la iepuri albinoși [307].

Tabelul 49

Concentrația de MK-927 în diverse compartimente ale ochiului de iepure albinos în urma administrării unei picături de soluție 2% (pH 4,5) direct în ochi (exprimată ca medie ± eroare standard) [300]

Timp [a] (ore)	Concentrația de MK– 927 (μM)				
	Umoarea apoasă		Cornee	Uveea anterioară	Procesele ciliare
	Anter.	Poster.			
0,5	20±2	–	160±10	12±2	–
1	32±3	4±1	108±10	32±8	15±3
3	19±2	3±1	56±14	17±2	11±1
9	3±0,2	2±0,3	8±1	10±2	8±1
24	0,5	2±1	1	4±1	4±2
$t_{1/2}$(h)[b]	3	8	3	2,1	8

[a] Timpul după administrarea drogului. [b] Timpul de înjumătățire pentru eliminarea sulfonamidei din compartimentul respectiv al ochiului.

Scanned with OKEN Scanner

În umoarea apoasă, concentrația maximă de inhibitor se atinge la o oră de la administrare; timpul de înjumătățire al drogului fiind de $t_{1/2}$ = 3 ore. Această caracteristică demonstrează că în permanență corneea furnizează inhibitor în camera anterioară. Fără drogul care vine din cornee, timpul de înjumătățire ar fi de numai 40 minute, similar cu cel al metazolamidei [154]. La 24 de ore nu se mai detectează inhibitor în acest compartiment al ochiului. În camera posterioară, la o oră, concentrația de drog este de 4 μM, iar descreşterea ei este lentă, cu $t_{1/2}$ = 8 ore. Pentru compusul MK-927 nu se cunoaşte încă mecanismul prin care el ajunge în acest compartiment al ochiului, dar probabil că muşchiul ciliar şi camera anterioară furnizează o concentrație constantă şi mică de inhibitor.

Concentrații foarte mari de inhibitor se ating la nivelul corneei probabil datorită stromei, care conține macromolecule anionice printre constituenții săi şi concentrează astfel compuşi cationici [307]. Deoarece volumul corneei este de o treime din cel al camerei anterioare, iar concentrațiile inițiale de drog sunt de 8 ori mai mari în cornee, este clar că acest segment constituie un „depozit" şi o barieră pentru MK-927. După această penetrare inițială, compusul difuzează apoi în alte compartimente învecinate ale ochiului; timpul de înjumătățire al derivatului MK-927 fiind şi pentru cornee de 3 ore [307].

În uveea anterioară, concentrația maximă de MK-927 este atinsă la o oră, după care dispare relativ repede ($t_{1/2}$ = 2 ore). Drogul este însă prezent şi la 24 de ore, persistența fiind încă neexplicată ca mecanism [307].

În procesele ciliare se ating concentrații suficient de mari de MK-927 pentru a inhiba AC în proporție de peste 99,9%. Nu se cunoaşte modul de legare al drogului în acest compartiment al ochiului. O caracteristică încă neexplicată a compusului este că efectul de descreştere al presiunii intraoculare încetează la 9 ore de la administrare, deşi timpul de înjumătățire este de 8 ore. Eficacitatea drogului este de necontestat, aşa cum au demonstrat studiile pe animale. Astfel, după o singură picătură de soluție 2% MK-927, presiunea intraoculară descreşte cu 3 mm Hg la iepure [307].

Într-un studiu pe 24 de bolnavi voluntari cu glaucom bilateral, s-a demonstrat de asemenea că o picătură de soluție 2% de MK-927 aplicată doar într-unul dintre ochi, a produs o descreştere a presiunii intraoculare cu o medie de 10,5 mmHg, la 4,5 ore de la administrare, comparativ cu ochiul netratat. (Fig. 18) [308].

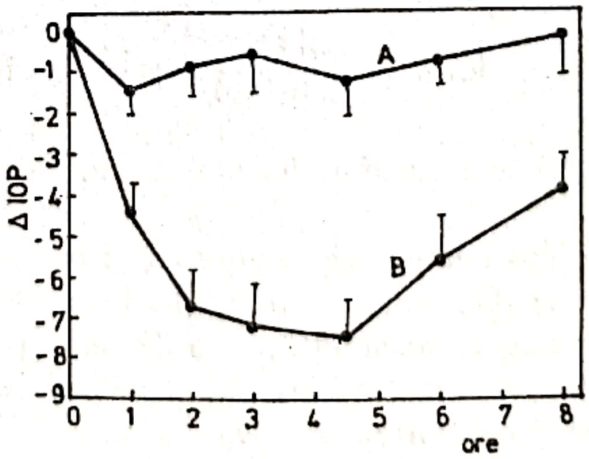


Fig. 18. Variația presiunii intraoculare (Δ IOP) față de ochiul netratat (A) în urma administrării unei picături soluție 2% de MK-927 (B).

Scanned with OKEN Scanner

După cum s-a arătat, farmacologia celor doi derivaţi de tieno-tiopiransulfonamidă, MK-927 şi MK-507, este similară. Astfel, într-un studiu pe maimuţe, Wang şi colab. [309] au arătat că aplicarea a 50 µL soluţie 2% de MK-507 în ochi a condus la scăderi ale presiunii intraoculare de 14-16 mmHg, timp de 7 ore. De asemenea, compusul pare a fi lipsit de toxicitate, analog derivatului MK-927.

Efectul şi proprietăţile observate în cursul tratamentului cu IAC topici, precum: reducerea rapidă şi de durată a presiunii intraoculare elevate din glaucom, absenţa efectelor secundare şi a toxicităţii, dozele mici necesare, simplitatea terapiei etc., fac din aceşti agenţi farmacologici, potenţiale medicamente antiglaucomatoase deosebit de valoroase, care probabil că vor fi utilizate extensiv în viitorul nu foarte îndepărtat.

Scanned with OKEN Scanner

8. APLICAȚIILE INHIBITORILOR ANHIDRAZEI CARBONICE ÎN MEDICINĂ

8.1. Inhibitorii anhidrazei carbonice şi echilibrul acido-bazic

Integrarea morfo-funcțională a diverselor structuri ale organismului necesită menținerea unei homeostazii care implică existența unui echilibru acido-bazic al fluidelor intra- şi extracelulare, la valori ale pH-ului sanguin de 7,35-7,40 [16].

Zilnic, prin alimentație sunt introduşi în organism 50-70 mEq H^+, care se adaugă celor 20 mEq produşi prin metabolism [310]. Cu toate că nu există mecanisme specifice de reglare a echilibrului acido-bazic, pH-ul fluidelor extracelulare se menține constant. În menținerea constantă a acestor valori intervin sistemele tampon biologice reprezentate prin: hemoglobină/oxihemoglobină; acizii nucleici/sărurile lor de sodiu; fosfații; lactatul/acidul lactic și bicarbonatul/acidul carbonic [16, 310].

Echilibrul acido-bazic este astfel reprezentat de ansamblul proceselor care permit menținerea constantă a concentrației ionilor de H^+ din organism.

În sânge, concentrația ionilor de H^+ este strâns corelată cu cea a CO_2, HCO_3^- şi H_2CO_3 [16], care la rândul lor se găsesc într-un echilibru în care intervin diversele izozime ale AC. (Secțiunea 2.3.)

Ținând cont de legea lui Henry (ecuația 26) şi de ecuația Henderson-Haselbalch (27), se poate calcula pH-ul sângelui arterial în funcție de concentrația de bicarbonat din plasmă (sânge) şi presiunea parțială a CO_2 [16]:

$$[CO_2]_{dizolvat} = p_a \times [CO_2]_{atmosferic} \tag{26}$$

$$pH = 6,1 + \lg \frac{[HCO_3^-]_{plasmatic}}{0,03 p CO_2} \cong 7,4 \tag{27}$$

În ecuația 27, valoarea pK_a a acidului carbonic este 6,1, şi constanta lui Henry pentru CO_2 este de 0,03.

AC joacă un rol esențial în menținerea echilibrului acido-bazic, alături de hemoglobina (Hb) întrucât catalizează reacția dintre CO_2 şi apă, prin care se formează H^+ şi ioni bicarbonat. Cele două proteine se găsesc în eritrocite în cantități apreciabile [16, 310]. Dioxidul de carbon format la nivel tisular în urma oxidărilor metabolice trebuie eliminat, ceea ce se realizează în pulmon, iar de transportul său până la acest organ sunt responsabile aceste două proteine. Aproximativ 85% din CO_2 format tisular este transportat în sânge sub formă de bicarbonat (format

Scanned with OKEN Scanner

prin hidratarea CO_2, catalizată de AC, sau în reacţia necatalizată); 11% este transportat sub forma de carbamino-hemoglobină (sub forma carbamatului instabil, format prin reacţia unor resturi H_2N-terminale ale proteinei cu CO_2), iar restul de 4% sub formă dizolvată (fizic) în fluidele corporale (plasmă) [310].

În plămâni, din contră, AC de la acest nivel (izozimele AC II şi AC IV) [16, 28] catalizează reacţia inversă, de deshidratare a bicarbonatului la CO_2, care este astfel eliminat în atmosferă [16]. Prin acest ciclu de hidratare/deshidratare, la un adult supus unei alimentaţii normal carnate, zilnic sunt tamponaţi 20-30 mMoli CO_2, proveniţi din metabolism (Fig. 19) [311].

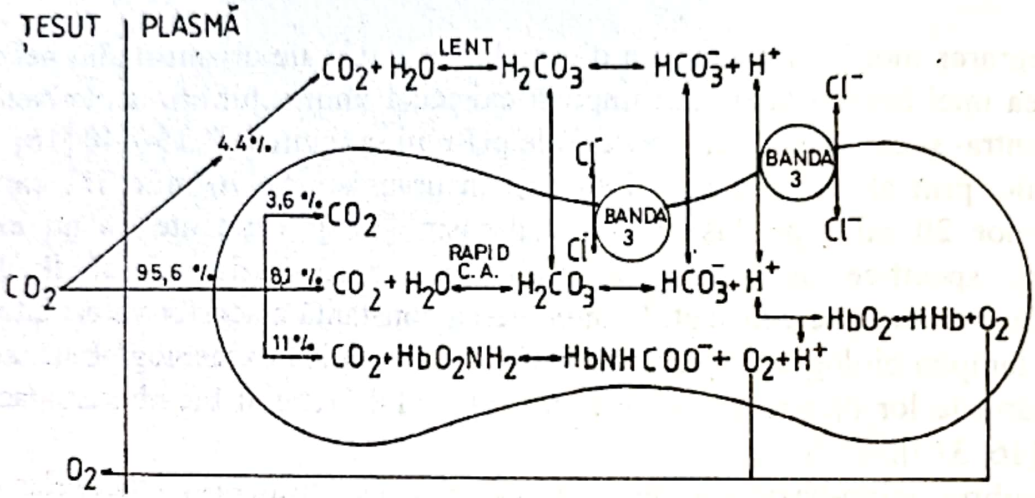


Fig. 19. Mecanisme de transport sanguin al dioxidului de carbon.

Dezechilibrele acido-bazice ale organismului sunt frecvente în diverse stări fiziopatologice (figura 20).

În tabelul 50 este redat modul în care concentraţia de bicarbonat şi respectiv presiunea parţială a CO_2 suferă modificări în cazul disfuncţionalităţilor acido-bazice.

Tabelul 50

Variaţia concentraţiei de bicarbonat şi respectiv a presiunii parţiale a CO_2 în diferite tipuri de disfuncţii acido-bazice.

Disfuncţia acido-bazică	$[HCO_3^-]$ (23–27 mM)[a]	p_{CO_2} (38–42 mmHg)[a]
Acidoza respiratorie compensată	↑	↑
Acidoza respiratorie decompensată	↑	↑↑
Alcaloza compensată respirator	↓	↓
Alcaloza respiratorie decompensată	↓	↓↓
Acidoza metabolică compensată	↓	↓
Acidoza metabolică decompensată	↓↓	↓↓
Alcaloza metabolică compensată	↑	↑
Alcaloza metabolică decompensată	↑↑	↑↑

[a] Intervalul de valori normale.
↑ = creşte; ↓↓ = descreşte.

Scanned with OKEN Scanner

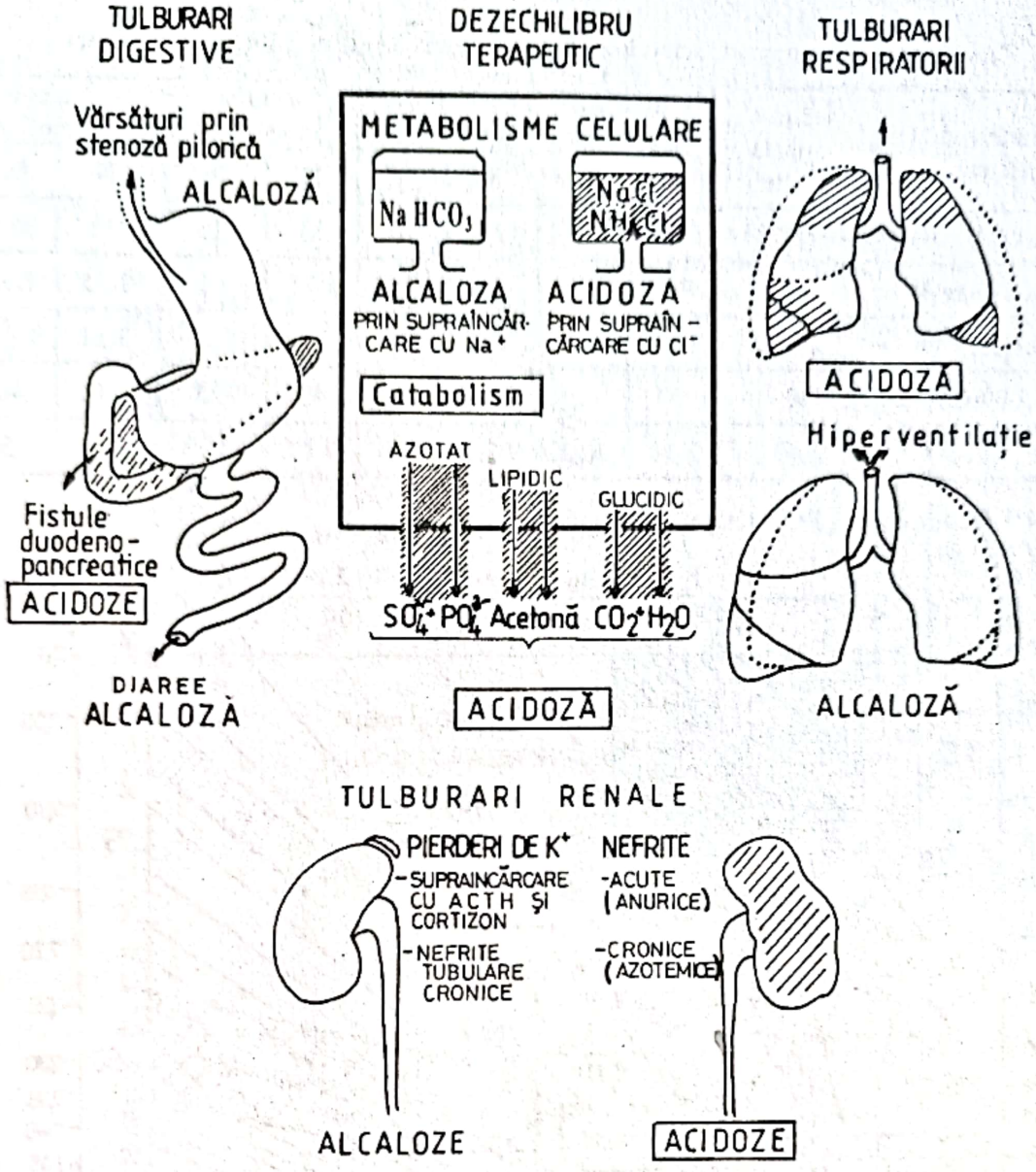


Fig. 20. Mecanisme patogenice de producere a dezechilibrelor acido-bazice.

Deşi, în general, la dozele utilizate terapeutic, IAC nu afectează transportul de CO_2, la bolnavii cu insuficienţă respiratorie cronică, aflaţi sub oxigeno-terapie, lucrurile sunt diferite, deoarece creşterea presiunii parţiale a O_2 are drept urmare deprimarea transportului CO_2. IAC sunt totuşi utili clinic în tratamentul retenţiei cronice de dioxid de carbon, când micşorează hipercapnia [295]. În astfel de cazuri s-a dovedit că o proporţie mai mare de CO_2 este transportată spre pulmoni în forma dizolvată fizic şi prin carbamino-Hb [290, 295].

IAC (precum acetazolamida, metazolamida, etoxzolamida) reprezintă terapia de elecţie a acidozelor respiratorii din cordul pulmonar cronic (compensat şi decompensat) [312]. În tabelul 51 sunt redate valorile unor parametri de investigaţie care caracterizează diversele dezechilibre acido-bazice, iar în figurile 21 şi 22, nomograme cu ajutorul cărora se poate determina tipul acestor dezechilibre în contextul cunoaşterii valorilor anumitor parametri fizico-chimici din organism.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 51

Variația principalilor parametri de investigație în diverse dezechilibre acido-bazice

Parametru plasmatic	Valoare normală medie	Acidoza respiratorie		Alcaloza respiratorie		Acidoza metabolică		Alcaloza metabolică	
		N	PC	N	PC	N	PC	N	PC
$[HCO_3^-]$(mM)	27	27	38	27	20	15	15	38	34,5
$[H_2CO_3]$(mM)	1,35	2,7	2,7	0,6	0,6	1,35	0,75	1,35	1,35
HCO_3^-/H_2CO_3	20:1	10:1	14:1	45:1	33,3:1	11,5:1	20:1	30:1	25,6:1
P_{CO_2}(mmHg)	40	90	90	20	20	40	25	40	40
pH	7,40	7,10	7,32	7,70	7,50	7,10	7,30	7,57	7,55

N = necompensată; PC = parțial compensată.

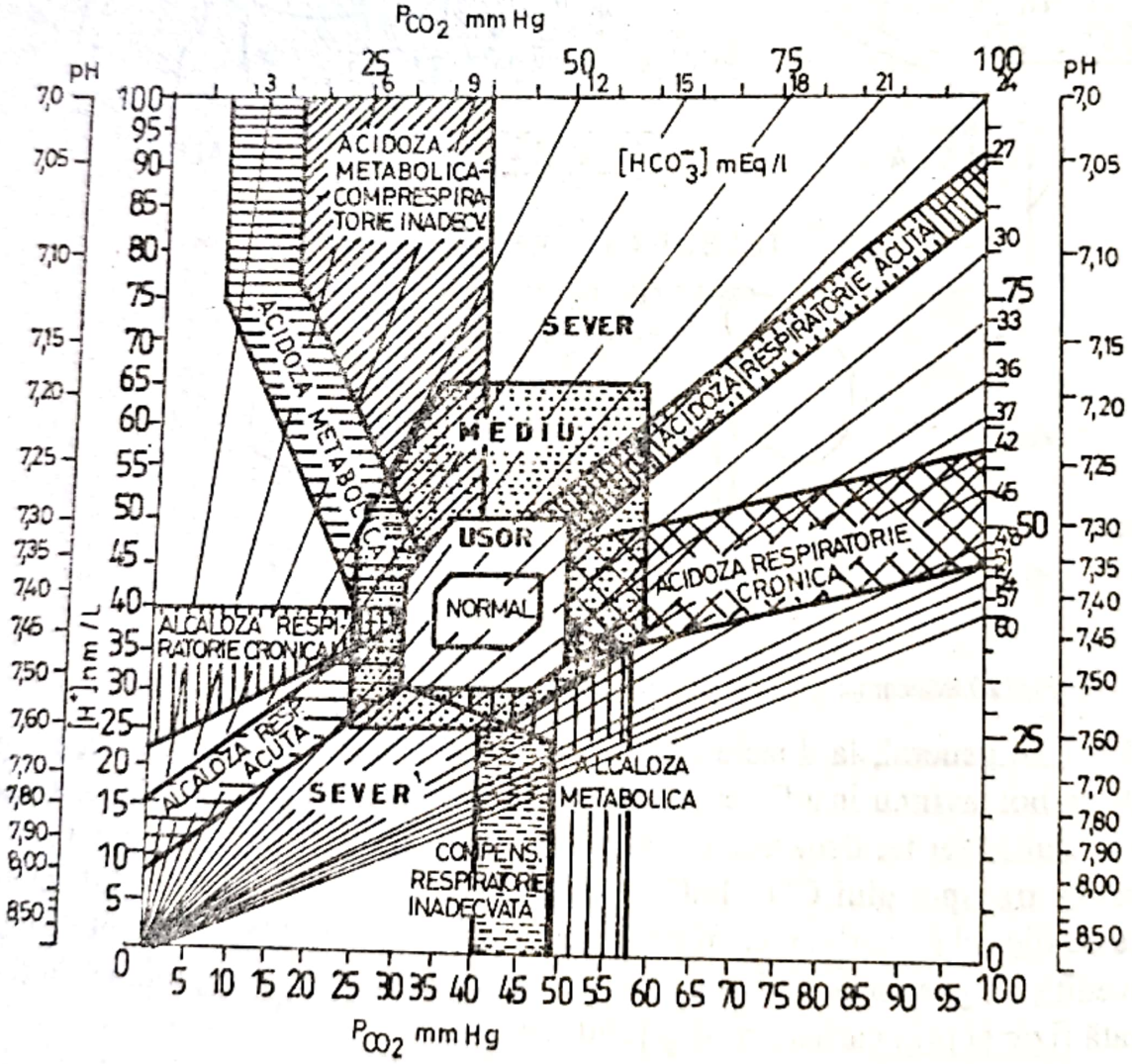


Fig. 21. Nomograma pentru determinarea tipurilor de dezechilibre acido-bazice la om.

În cordul pulmonar cronic, ca și în insuficiența cardiacă congestivă, IAC au un efect slab diuretic, reducând în același timp hipercapnia, cu micșorarea dispneei. În paralel, utilizarea IAC în astfel de afecțiuni reușește să combată tendința la alcaloza hipocloremică produsă de alte diuretice.

Scanned with OKEN Scanner

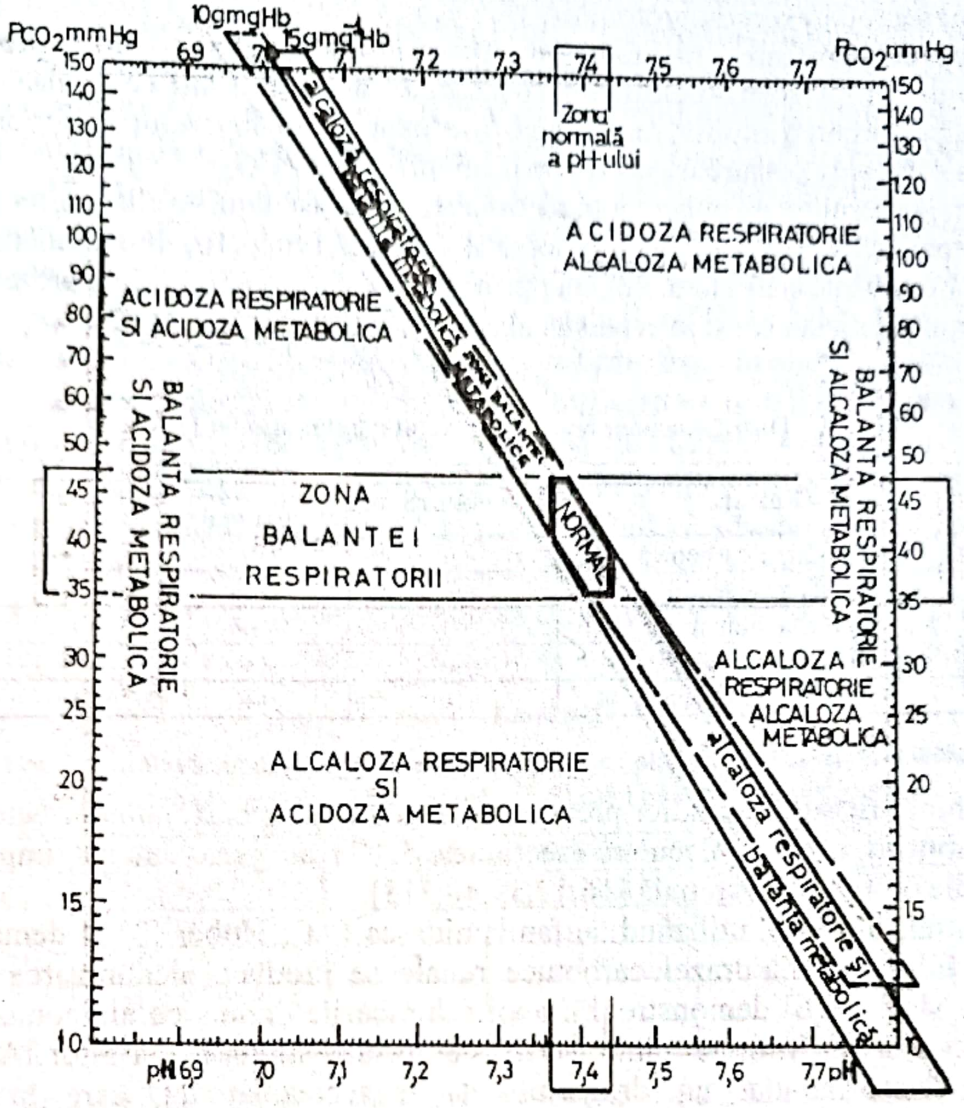


Fig. 22. Nomograma pentru aprecierea dezechilibrelor la pacienți cu tulburări ale echilibrului acido-bazic.

Rezultate terapeutice favorabile se obțin de asemenea utilizând IAC în insuficiențele respiratorii din cifoscolioză şi obezitate [312]. La obezi, pe lângă acțiunea diuretică produsă de IAC se observă şi o scădere ponderală [16, 17, 301].

Rezultate bune se obțin prin utilizarea IAC şi în tratamentul edemelor cardiace refractare, în edemele cirotice cu ascită persistentă sau la bolnavii cu sindrom nefrotic. Şi în combaterea edemelor carențiale, administrarea acetazolamidei a fost benefică, deoarece inhibiția absorbției proximale, în conjugare cu inhibiția absorbției de NaCl în ansa lui Henle ajută la obținerea unei diureze puternice, cel puțin la începutul terapiei. În stările edematoase, utilizarea IAC este recomandabil a se combina cu un diuretic de ansă, de exemplu furosemidul [312].

8.2 Inhibitorii anhidrazei carbonice şi fiziologia renală

În reglarea echilibrului acido-bazic al organismului, alături de sistemele tampon (secțiunea 8.1), intervin şi rinichii, care acționează controlând:

Scanned with OKEN Scanner

a) secreția/excreția protonilor;

b) regenerarea/recuperarea bicarbonatului; precum și prin procesul de amonogeneză. Mecanismele renale de reglare a echilibrului acido-bazic intervin atât la perturbări primitiv metabolice (de exemplu a nivelului bicarbonatului în plasmă), cât și la perturbări ventilatorii (modificarea pCO_2).

În procesul de menținere a homeostazieie organismului, se elimină renal H^+ și se resorb ioni HCO_3^-; prin astfel de procese se acidifică urina [16]. În fenomenele de mai sus sunt implicate mai multe enzime, printre care și AC (tabelul 52), prezentă atât în segmentul proximal, cât și în cel distal al tubului contort [16].

Tabelul 52

Distribuția unor enzime la nivelul tubului urinifer [16].

Enzima	Glomerul	Tub contort	
		proximal	distal
Anhidraza carbonică	–	+	+++
Fosfataza alcalină	+	+++	+
Transaminaza glutam-piruvică	+	+++	++
Lactat dehidrogenaza	+	++	++
Malat dehidrogenaza	–	++	++

– absentă; + prezentă.

Inhibitorii sulfonamidici precum sulfanilamida, acetazolamida, benzolamida sau inhibitorii macromoleculari (secțiunea 5.4.1) au jucat un rol important în cercetările de fiziologie renală [16,17,39,48,313].

Astfel, în 1942, utilizând sulfanilamida ca IAC, Hober [313] demonstrează că prin inhibiția anhidrazei carbonice renale se produce alcalinizarea urinii la broască. Maren [16] demonstrează, apoi schimbările dramatice ale compoziției în electroliți a urinii în urma administrării de acetazolamidă sau a altor IAC (ca de exemplu benzolamida, un drog înrudit cu acetazolamida, care la anumite concentrații inhibă selectiv doar enzima renală [16]) (secțiunea 7.1 – tabel 47). Prin astfel de experimente au putut fi stabilite mecanismele de reabsorbție ale bicarbonatului în tubul contort proximal [16, 314] (Fig. 23).

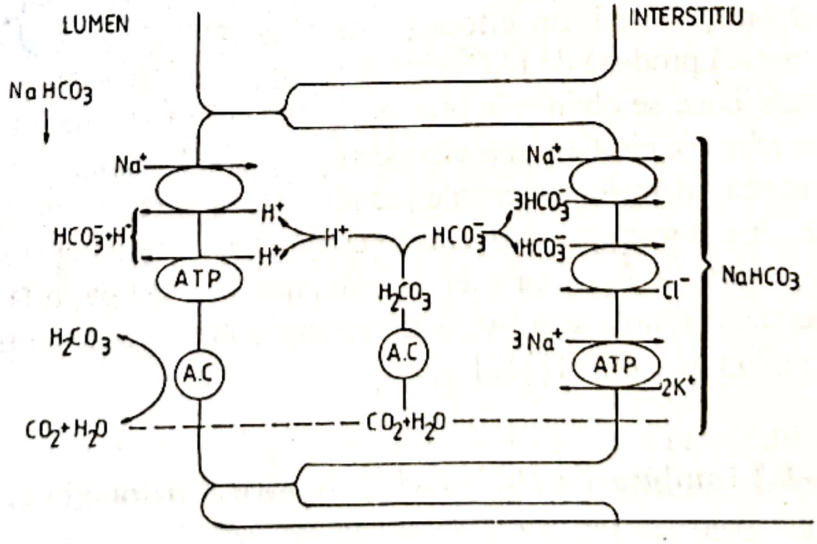


Fig. 23. Mecanismele celulare de reabsorbție a bicarbonatului la nivelul celulelor tubului contort proximal [16].

Scanned with OKEN Scanner

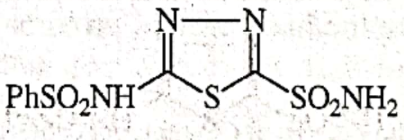
În rinichi sunt prezente două izozime ale AC, şi anume tipul II (în citozol), şi AC IV, ataşată membranei marginii în perie a celulelor tubulare proximale, având situsul activ orientat spre lumen [42]. În tubul contort proximal, 66-85% din bicarbonatul filtrat glomerular este reabsorbit. Prin inhibiţia AC (cu acetazolamida sau alt IAC), această reabsorbţie este diminuată, ceea ce determină o cotă mai mare de HCO_3^- care rămâne în urina finală, ce devine astfel alcalină. Rolul fundamental al AC în rinichi este acela de a produce acid, prin reacţia CO_2 cu apa, în celulele tubului proximal şi distal. Practic, celulele renale pot fi privite ca nişte celule specializate în separarea apei în ioni H^+ şi HO^- [16]. Ionii HO^- sunt tamponaţi de către CO_2, cu formare de bicarbonat care trece în plasmă, pe când protonii sunt secretaţi prin membrana luminală. În tubul contort proximal ei servesc pentru reabsorbţia a aproximativ 30% din bicarbonatul filtrat. Aproximativ 20% din bicarbonatul filtrat poate ajunge în tubul distal unde continuă reabsorbţia sa. La nivelul celulelor epiteliale ale tubului contort proximal, ionul bicarbonat se poate reabsorbi şi printr-un mecanism activ de reabsorbţie [16]. În tabelul 53 este redat conţinutul fluidului tubului contort proximal (la şobolan) în mod normal şi după inhibiţia cu CL 11,366 (clorazolamida), un inhibitor puternic a cărui structură este redată în clişeul 67.

Tabelul 53

Conţinutul fluidului din tubul contort comparativ cu plasma în mod normal şi după inhibiţia cu sulfonamida heterociclică CL 11,366 (vezi textul pentru structura acesteia) [16].

Component	Plasma [a]	Tub contort proximal mijlociu	
		normal	după CL 11,366
HCO_3^- (mM)	20	10	30
CO_2 (mM)	1,2	1,2	1,2
H_2CO_3 (μM)	3	3	20
pH la echilibru [b]	7,4	7,1	7,6

[a] Concentraţiile plasmatice sunt considerate egale cu cele din fluidul tubular proximal iniţial [16]. [b] Calculat considerând constanta de aciditate a acidului carbonic $pK_{a1} = 6,17$ [16].



CL 11.366 (benzolamida)

Practic, aproximativ 1/3 din bicarbonatul reabsorbit provine din hidratarea necatalizată a CO_2, iar restul în urma reacţiei catalizate de enzimă. Pe segmente ale nefronului, Rector [315] considera că aproximativ jumătate din secreţia de ioni de H^+ a rinichiului revine tubului contort proximal, iar diferenţa celui distal şi colector (figura 24: A – pentru tubul proximal; B – pentru cel distal).

Caracteristica celulelor tubului contort distal şi colector este specializarea în transportul şi secreţia de H^+ şi K^+ (printr-un mecanism comun) contra unor gradienţi mari a celor doi ioni (figura 24 B). La acest nivel, protonii sunt secretaţi activ, în competiţie cu ionul de K^+, pentru schimbul cu ionii de Na^+, care sunt reabsorbiţi. În momentul în care ionii de H^+ sau de K^+ sunt secretaţi în cantitate redusă, este compensată

Scanned with OKEN Scanner

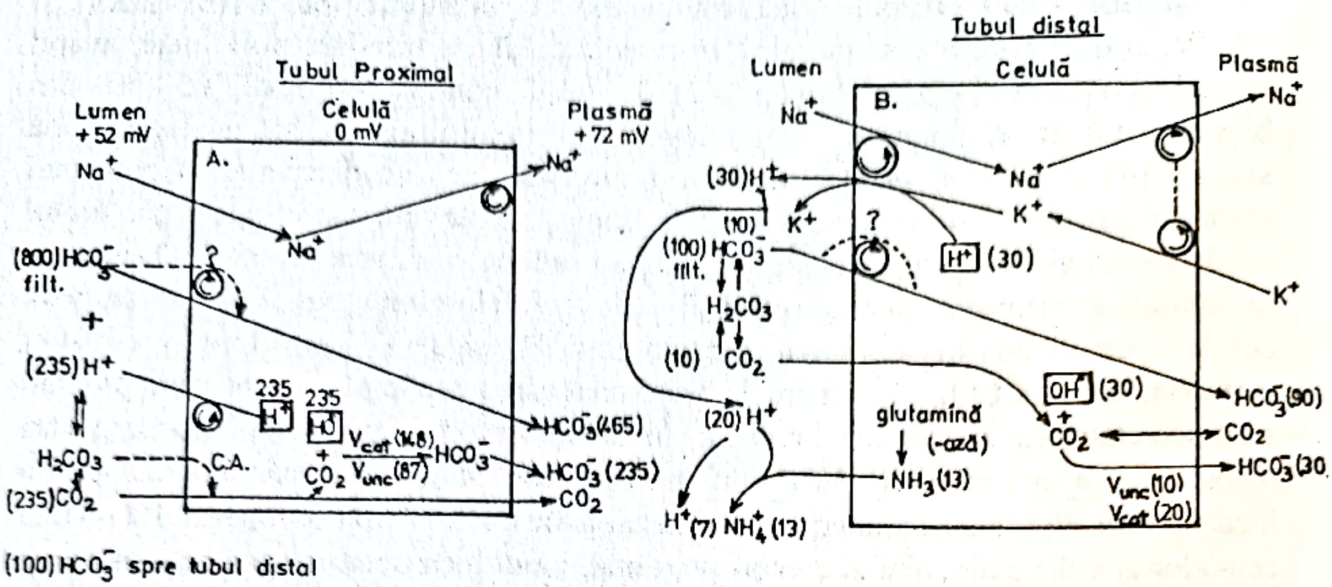


Fig. 24. Sistemul bicarbonat – dioxid de carbon în tubul proximal (A) şi în tubul distal (B). Numerele din paranteză reprezintă viteze de reacţie (în $\mu M \times min^{-1}$); săgeţile circulare reprezintă procese active (adaptate după ref. [16]).

secreţia celuilalt ion. Prin inhibiţia AC, secreţia ionilor de K^+ este mărită, urina alcalinizându-se. Inhibiţia AC cu sulfonamide afectează şi altă enzimă implicată în formarea urinii, şi anume H^+-ATP-aza, care în aceste condiţii nu mai poate genera un gradient suficient de mare de pH pentru acidifierea urinii din lumenul tubului urinifer.

În afară de reacţia cu bicarbonatul, la nivelul tubului contort distal (spre deosebire de cel proximal), protonii sunt utilizaţi şi pentru reacţia cu anionii altor acizi slabi prezenţi. Aproximativ 15% din cantitatea de ioni de H^+ secretaţi de către rinichi se elimină la nivelul tubului contort distal [16]. Spre deosebire de tubul contort proximal, în cel distal ionii de H^+ secretaţi reacţionează mai încet cu bicarbonatul, AC jucând astfel un rol mai redus. Viteza de reabsorbţie a bicarbonatului în segmentul distal al tubului nefronului este apreciată la 7–20% din valoarea celei care are loc în segmentul proximal al tubului contort.

Tabelul 54

Modelul echilibrului luminal al CO_2 în tubul contort (TC) distal şi tubul colector [16].

Component	Tub contort distal		Tub colector (normal)
	normal	după CL 11,366	
HCO_3^- (mM)	5	5	0,12
CO_2 (mM)	1,2	1,2	1,2
H_2CO_3 (μM)	15	3	[a]
pH la echilibru [b]	6,8	6,8	[a]

[a] Parametru care nu a putut fi determinat [16]. [b] Vezi tabelul 53.

În tabelul 54 este redată compoziţia fluidului din tubul contort distal şi tubul colector, care se observă că diferă apreciabil de compoziţia fluidului tubului contort proximal (tabelul 53). După inhibiţia maximală a AC cu sulfonamide, aproximativ 20% din bicarbonatul filtrat nu mai poate fi reabsorbit în celulele tubului contort proximal, iar în condiţii de încărcare cu soluţii tampon, această valoare poate ajunge până la 40% [16].

Scanned with OKEN Scanner

Studii experimentale (de tip flux-oprit şi de micropunctură) [16,17,313-315] au demonstrat că IAC acţionează aproape numai la nivelul segmentului proximal al tubului contort. La nivelul celui distal, inhibiţia enzimei devine manifestă doar la viteze mari de reabsorbţie ale ionilor de bicarbonat.

Eliminarea în cantităţi crescute prin urină a ionilor bicarbonat ca urmare a inhibării AC cu sulfonamide, are drept urmare o excreţie crescută a ionilor de Na^+ şi a apei (tabelul 47).

Acidoza intracelulară observată în acidozele metabolice/respiratorii severe, reduce sau blochează efectele renale ale inhibiţiei AC prin sulfonamide. Un efect similar induce şi hipopotasemia, care conduce la alcaloza extracelulară, în paralel cu reducerea pH-lui intracelular [16]. Diminuarea efectului diuretic al IAC, este independentă de scăderea bicarbonatului filtrat, iar un efect similar se constată după prelungirea inhibiţiei enzimei cu orice tip de IAC administrat sistemic [16].

Efectele unor perturbări ale echilibrului acido-bazic asupra rinichiului sunt prezentate schematic în tabelul 55.

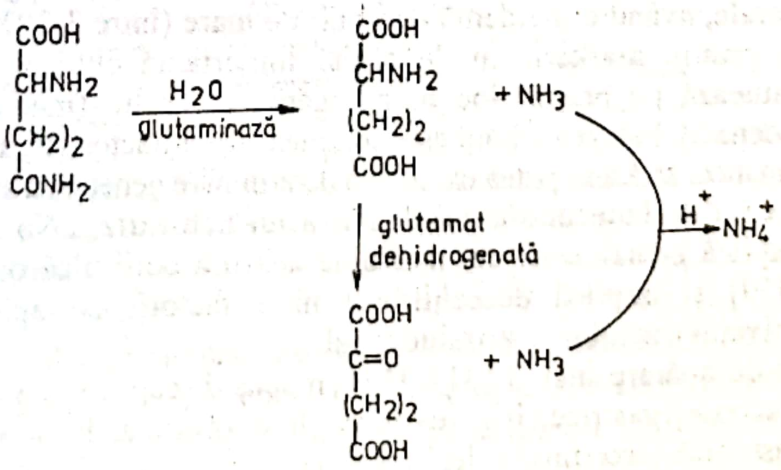
Tabelul 55

Efectele unor perturbări renale asupra echilibrului acido-bazic din organism [16].

Procedura de perturbare fiziologică	Concentraţiile plasmatice			$[H^+]$ în celula renală
	$[H^+]$	$[HCO_3^-]$	P_{CO_2}	
Administare de NH_4Cl sau acid	↑	↓	↓	↑
Introducerea unei depleţii potasice	↓	↗	↑	↑
Administrarea de acetazolamidă	↑	↗	↓	↑
Inhalarea unui exces de CO_2	↑	↑	↑	↑
Administrarea de $NaHCO_3$ sau citrat de sodiu	↘	↗	↑	↓
Hiperventilare	↓	↓	↓	↓

↑ = creştere; ↓ = scădere; ↘, ↗ = parametru puţin afectat.

După cum s-a amintit deja, protonii secretaţi în citosol (prin hidratarea CO_2, în prezenţa AC), ajung prin excreţie în lumenul tubilor renali, putând fi captaţi şi de amoniacul format prin dezaminarea glutaminei de către glutaminază, sau prin transaminare, în prezenţa glutamat-dehidrogenazei (schema 27).



Schema 27

Scanned with OKEN Scanner

Amoniacul format în urma unor astfel de reacţii este transportat în lumenul urinifer distal, unde se combină cu protonii generaţi în urma hidratării (catalizate de AC) a CO_2 (figura 25).

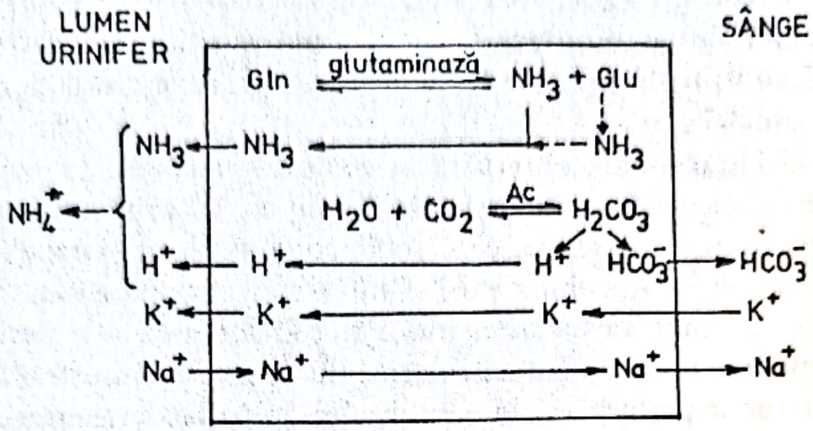


Fig. 25. Implicarea AC în amonogeneză în rinichi.

Un adult normal, excretă 40–160 mEq/zi NH_4^+ [312]. Transportul ionilor de H^+ prin membrana tubulară apicală se face prin două mecanisme:

(1) schimb ionic, paritar Na^+/H^+;

(2) prin intermediul H^+-ATP-azei (care schimbă ionul de H^+ pentru cel de K^+) [316].

Primul mecanism îşi derivă energia din gradientul concentraţiei ionului Na^+ de-a lungul membranei luminale (figura 25), iar cel de-al doilea prin hidroliza ATP, moleculă bogată în energie, care reprezintă „valută" energetică într-o multitudine de sisteme biologice (figura 25h) [310]. Ca şi la celula parietală gastrică (secţiunea 8.3.), unde AC este îndeaproape cuplată cu H^+/K^+-ATP-aza, şi în rinichi cele două enzime (AC şi H^+-ATP-aza) se influenţează reciproc.

8.3. Aplicaţii în gastroenterologie

8.3.1. *Anhidraza carbonică şi funcţia secretorie gastrică*

Boala ulceroasă rezultă prin tulburarea homeostaziei locale gastro-duodenale şi a celei generale, având o incidenţă deosebit de mare (între 3-20% din populaţie) [317]. Aflată printre markerii cu deosebită importanţă clinică, hiperactivitatea gastrică se situează pe primul loc în patogenia ulcerului (mai ales a celui cu localizare duodenală). Patogenia bolii este complexă, multifactorială, având caracter de boală psihosomatică, fără a se putea exclude o determinare genetică a sa [317, 318].

Ţinând cont de binecunoscutul dicton a lui Schwartz, „No acid, no ulcer", teoria care explică actualmente cel mai bine apariţia bolii ulceroase, aparţine lui Hollander [319] şi implică dezechilibrul între factorii de apărare şi cei de agresiune la nivelul tractului gastro-duodenal.

Factorii de apărare includ [317-319]: mucusul, capacitatea de regenerare a epiteliului mucoasei gastrice, irigarea normală a acesteia, hormonii digestivi cu acţiune antigastrinică (secretina, colecistokinina, bulbogastrona, enterogastrona, VIP, peptida gastro-intestinală, glucagonul etc.). precum şi integritatea mucoasei gastrice.

Scanned with OKEN Scanner

Factorii de agresiune sunt reprezentaţi de: refluxul duodeno-gastric (favorizat de: fumat, alcool, alimente iritante, tensiune nervoasă), anormalităţile de motilitate ale pilorului, factorul pancreatic, hipertoniile vagale, descărcările mari de histamină, ingerarea de medicamente ulcogene cum ar fi aspirina, antiinflamatoarele nesteroidiale, stress-ul etc.

Deficienţa factorilor de apărare la nivel gastric determină apariţia ulcerelor cu această localizare, pe când în ulcerul duodenal predomină factorii de agresiune asupra mucoasei acestui organ. Cel mai frecvent însă, cele două tipuri de factori au o acţiune simultană şi intricată.

Localizarea ulceraţiei este dependentă de particularităţile anatomo-funcţionale ale unor zone din tractul gastro-duodenal. Regiunile de tranziţie ale mucoasei, precum şi zonele de încrucişare ale fibrelor musculare longitudinale cu cele oblice sunt cele mai afectate (figura 26) [320].

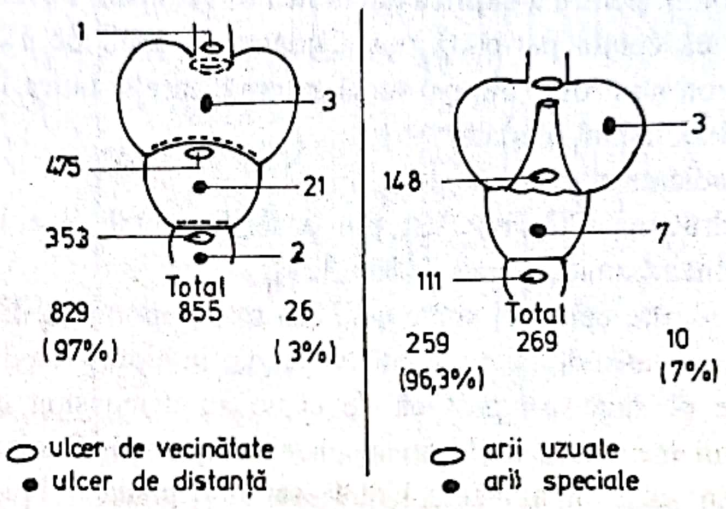


Fig. 26. Schema ulcogenezei şi conceptul de „risc ulceros". Cifrele reprezintă numărul de cazuri de ulcer în zonele respective (statistica lui Oi şi colab. [320]).

Produsul de secreţie gastrică, sucul gastric, este un amestec al secreţiilor diverselor celule gastrice, şi electroliţi, proteine, şi în special, acid clorhidric (tabel 56).

Tabelul 56

Compozitia sucului gastric.

Component	Concentraţia (mM)
K^+	10 – 110
Na^+	5 – 60
Cl^-	140 – 200
proteine	variabil
pH	0,9 – 1,2
Volumul secreţiei (mL)	1200 – 2000

Secreţia de HCl în stomac are loc în celula parietală [317-319]. Un adult normal, are $1–2 \cdot 10^9$ celule parietale, care pot genera o secreţie acidă stimulată maximal, de 22-23 mEq/h H^+. S-a putut determina experimental că 1 mEq H^+ este secretat de 50 milioane de celule parietale gastrice active [318]. La persoanele cu ulcer duodenal, numărul celulelor parietale este crescut de 2-6 ori comparativ cu

Scanned with OKEN Scanner

numărul normal [312, 317]. În consecință, debitul de HCl secretat de stomac la persoanele cu ulcer duodenal este în majoritatea cazurilor, de asemenea, crescut. În ulcerul gastric se pare că masa de celule parietale este normală (datorită prezenței gastritei cronice difuze de însoțire) [317, 318].

Studii pe celule parietale izolate [321] au demonstrat că secreția HCl are loc la polul secretor (luminal), iar cea de bicarbonat la polul nutritiv fiind echimolară. Această importantă descoperire a lui Soll [321] a ridicat următoarele probleme:

(1) de unde provin ionii de H^+, Cl^-, bicarbonat neceasar secreției;

(2) cum sunt transportați acești ioni;

(3) care sunt reacțiile chimice asociate acestor procese ?

Ținând cont de raportul concentrațiilor ionilor de H^+ în stomac și respectiv în plasmă, care este de 150–170 : 0,0005, reiese clar că în întreg organismul nu există suficienți protoni pentru a explica aciditatea din stomac. Pe de altă parte, este greu de imaginat că celula parietală poate concentra ionii de H^+ de $3–3,5 \cdot 10^6$ ori. Rezultă că protonii provin dintr-o sursă externă, care ar putea fi:

(1) metabolismul oxidativ;

(2) disocierea apei sau

(3) hidratarea CO_2 rezultat din arderile metabolice în prezența AC, cu formarea de bicarbonat și ioni H^+ [317,321].

Ultima dintre cele trei surse este cea mai importantă, Emas [322] apreciind că 80% din cantitatea de H^+ secretată provine prin hidratarea dioxidului de carbon.

Studiile pe mucoasa gastrică de câine au demonstrat că prin stimulare cu histamină, unii metaboliți implicați în glicoliză (precum fructoz-1,6 difosfat, oxalil-acetat, fumarat, succinat, alfa-cetoglutarat) sau în degradarea lipidelor (glicerol, acetil-acetat, beta-hidroxibutirat etc.) au concentrații crescute în astfel de biopsii, pe când concentrația de glicogen scade [321]. Printre acești compuși apăruți în metabolismul intermediar nu s-a evidențiat un donator specific de protoni, dar oxidarea finală a ionilor de hidrură (din NADH; $FADH_2$) de către O_2, de-a lungul lanțului respirator generează un gradient de ioni H^+ după cum au demonstrat studiile clasice ale lui Mitchell [323]. Astfel, ionul de H^+ generat în urma metabolismului, poate constitui una dintre sursele necesare secreției gastrice acide, însă nu cea mai importantă. Cea mai mare parte a protonilor este generată prin hidratarea necatalizată sau catalizată de către AC, a dioxidului de carbon. AC a fost izolată în stomac de către Davenport [8] care a elaborat apoi și schema mecanismului secreției gastrice [9].

Wistrand și Lonnerholm [324] au evidențiat (prin tehnici radioimunologice; histochimice și măsurători cinetice) în stomac prezența izozimelor AC I și AC II. Enzima este absentă în celulele din regiunea cardiei, antrului și glandelor Brunner, dar este foarte abundentă în zona fundică și a corpului stomacului. În celula parietală, AC a fost pusă în evidența pe suprafețele externe ale microvililor din rețeaua canaliculilor, în interiorul microvililor, pe suprafața și cristele mitocondriilor, în veziculele reticulului endoplasmatic și în citoplasmă [324]. Prin tehnici de imuno-histologie a fost de asemenea pusă în evidență în duoden [325].

Scanned with OKEN Scanner

Izozima AC IV a fost evidenţiată histochimic [324] de-a lungul membranei apicale (la concentraţii scăzute) şi a celei bazo-laterale (concentraţiei ridicate), a celulelor epiteliale superficiale gastrice, unde se pare că joacă rolul cel mai important din punctul de vedere al secreţiei acide [155]. Până foarte recent, se considera că rolul major în sistemele secretorii îl joacă izozima AC II, prezentă la nivelul gastric predominant în celulele parietale [16, 34].

În gastritele şi duodenitele cronice se observă o descreştere a activităţii enzimatice a AC, în celulele epiteliale superficiale, ceea ce constituie un risc mărit de ulcogeneză.

Rolul AC în secreţia HCl din stomac a fost excelent evidenţiat de Davenport, care a elaborat prin schema mecanismului secreţiei gastrice acide (figura 27) [8, 9].

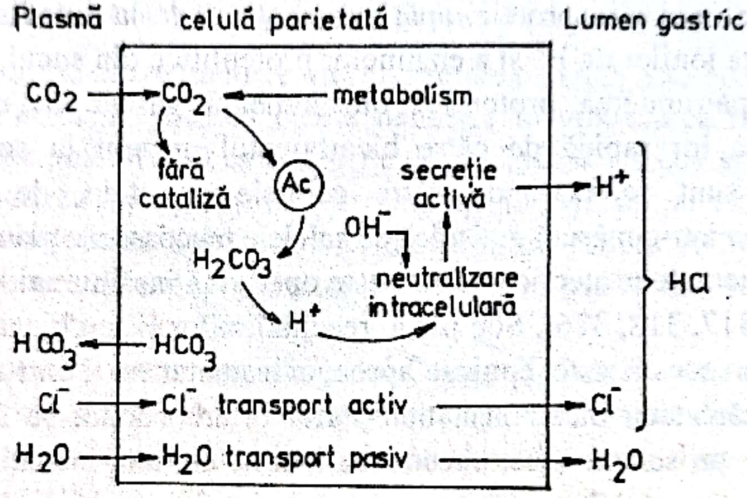


Fig. 27. Mecanismul secreţiei gastrice acide după Davenport [8].

Conform teoriei lui Davenport [8, 9] AC (indiferent de izozimă) joacă rolul central în acest proces, prin furnizarea de protoni, în urma reacţiei de hidratare a CO_2. Aceştia sunt preluaţi şi transportaţi în lumenul gastric. Anionii de bicarbonat, formaţi concomitent cu ionii H^+ sunt pe de altă parte transportaţi în plasmă. Evident, aceste procese sunt însoţite de transportul în sens invers al altor cationi/anioni (ca de ex. Cl^-; Na^+; K^+ etc.) pentru menţinerea electro-neutralităţii.

Actualmente este cunoscut faptul că mecanismul secreţiei acide gastrice imaginat de Davenport, deşi adevărat în mare măsură, este prea simplist. Totuşi AC joacă în aceste procese un rol deosebit de important. Practic ionii de H^+ rezultaţi în urma reacţiei catalizate de AC sunt preluaţi pentru a fi transportaţi în lumenul gastric de altă enzimă, şi anume de către H^+/K^+-ATP-aza [316], pompa de protoni izolată doar în celulele parietale ale stomacului. Protonii generaţi sunt deci preluaţi de această pompă, în timp ce AC tamponează ionii de HO^- generaţi (prin disocierea apei), cu formarea ionilor de bicarbonat.

Cele două enzime care sunt interdependente funcţional, sunt localizate una în vecinătatea celeilalte, în sistemul canicular secretor şi veziculo-tubular [316,318]. Pompa de protoni are însă şi un rol de reglare a secreţiei acide, fiind îndeaproape cuplată cu procesele metabolice, în care se generează energie. Secreţia de acid

Scanned with OKEN Scanner

clorhidric, este aşadar rezultatul unui complex de procese şi reacţii, care implică două enzime (AC şi H^+/K^+-ATP-aza), precum şi un notabil consum de energie (ATP). În urma acestor procese, pe lângă acid se formează şi bicarbonat, care are un rol important în apărarea mucoasei gastrice de agresiunea chimică a ionilor de H^+ din spaţiul luminal.

Hollander [319] şi Davenport [8,9] au demonstrat că funcţia de barieră faţă de aciditatea luminală a mucoasei gastrice o joacă mucusul. Prin secreţia de bicarbonat (mediată de AC), epiteliul mucoasei gastrice şi duodenale reuşeşte menţinerea unui pH apropiat de cel neutru la suprafaţa acestei mucoase. Se consideră că bariera de mucus stabileşte un microclimat superficial, un strat staţionar, care se regenerează în mod continuu prin ionii de bicarbonat care neutralizează acidul luminal. Secreţia de bicarbonat alcalinizează în permanenţă acest strat de gel glicoproteic, apărând mucoasa de la autodistrugerea epiteliului sub influenţa ionilor de H^+ şi a enzimelor proteolitice din sucul gastric [317].

Prin pătrunderea protonilor din lumenul gastric în mucus, se produce neutralizarea lor rapidă de către bicarbonatul prezent la acest nivel. Ionii de bicarbonat sunt secretaţi de către celulele parietale, de celulele epiteliale superficiale şi într-o măsură mai mică de celulele mucoase ale glandelor pilorice [326]. Această barieră de protecţie primară este operativă însă numai la valori ale pH-ului de peste 4 [317, 318, 326]. Sub pH 4, reacţia ionilor H^+ cu bicarbonatul este atât de rapidă, încât acesta este epuizat aproape instantaneu. Pentru ca mucusul să fie continuu încărcat cu bicarbonat, transportul bicarbonatului se face prin membrana apicală printr-un schimb electroneutru cu ioni de clorură. În schimbul ionilor de Cl^-, bicarbonatul din celulele parietale gastrice trece prin membrana bazală şi ajunge prin circulaţie la celulele epiteliale, de unde este apoi secretat în lumenul gastric. Cantitatea de bicarbonat ajunsă în circulaţie este dependentă de nivelul secreţiei de ioni H^+ din lumenul gastric şi de valoarea pH-ului sanguin [317].

8.3.2 Tratamentul ulcerelor gastro-duodenale cu inhibitori ai anhidrazei carbonice

Tratamentul bolii ulceroase are drept scop vindecarea ulceraţiei când există, dispariţia simptomelor, prevenirea recurentelor şi complicaţiilor. Principalele terapii medicamentoase ale acestei boli se bazează pe combaterea factorilor agresivi şi stimularea celor defensivi. În tabelul 57 sunt redate majoritatea principiilor terapeutice în lupta contra ulcerelor [317].

Tabelul 57

Tipuri de terapii antiulceroase şi agenţi farmacologici utilizaţi

Nr.	Scop terapeutic urmărit	Mijloc medicamentos
1	Neutralizarea secreţiei acide	Antiacide, alcaline
2	Reducerea secreţiei nestimulate	Anticolinergice
		Blocatorii receptorilor H_2-histaminici (cimetidina)
		Antigastrinicele (proglumid)

Scanned with OKEN Scanner

3	Diminuarea secreției acide bazale și stimulate (prin blocarea unor receptori, sau a unor enzime implicate în secreție)	Blocatorii mesagerilor secundari (Ca^{2+}) nifedipina)
		Inhibitorii H^+/K^+-ATP-azei (omeprazol)
		Inhibitorii anhidrazei carbonice (acetazolamida)
4	Creșterea secreției de mucus gastric, și vâscozitatea acestuia	Denol
		Prostaglandine
5	Stimularea secreției de bicarbonat	Esaprazol
6	Mărirea traficului gastric/duodenal	Metaclopramida, Cisaprid
7	Creșterea debitului sangvin în mucoasa gastrică[a]	Vasodilatatoare, Sulpirid
8	Corectarea dereglărilor nervoase vegetative	Anticolinergice
		Sedative
		Tranchilizante

[a] În ulcerele cronice volumul sangvin local este diminuat pe mica curbură cu peste 66% față de normal, iar în celelalte regiuni ale stomacului cu peste 75% față de normal. De menționat că și unii IAC precum acetazolamida, se pare că au un efect de vasodilatație puternică în vasele din stomac.

Prin inhibiția AC prezentă în celulele parietale cu IAC, este posibilă scăderea secreției gastrice acide bazale, cu efecte benefice în vindecarea nișei ulceroase [317,318,327]. Este posibil însă ca drogurile de tip IAC să posede și alte efecte, ca de exemplu producerea unei puternice vasodilatații [318], care ar explica eficiența lor deosebită în vindecarea bolii. Acțiune de inhibiție asupra AC se exercită nu numai asupra enzimei citozolice prezente în celula parietală (AC II), ci și asupra enzimei asociate membranelor (AC IV).

După cum au demonstrat cercetările lui Puşcas [317,318] tratamentul ulcerelor timp de 20-25 zile cu acetazolamidă conduce la un procent ridicat de vindecare: 82% din cazurile de ulcer gastric, și 95% din cele de ulcer duodenal. După 70 de zile de tratament cu IAC (acetazolamidă) se observă anaclorhidrie la 36% dintre pacienții cu ulcer gastric și 12% dintre cei cu ulcer duodenal. Puşcas a arătat de asemenea că efectul antiulceros al acestor agenți farmacologici se instalează după o perioadă de latență de 2-3 zile. După 70 zile de terapie cu IAC se produce o reducere a debitului de acid cu aproximativ 95% din valoarea inițială, la 88% din bolnavi.

Preparatul original românesc Ulcosilvanil (conținând acetazolamida) induce vindecarea nișei în 15-20 zile la 90% din cazurile tratate, iar prelungirea tratamentului la 6-7 săptămâni, ridică rata vindecării la 98% [317,318]. Aceste rezultate sunt semnificativ superioare comparativ cu cele ale altor terapii antiulceroase (utilizând antagoniști ai receptorilor H_2-histaminici, anticolinergice, antacide inhibitori ai H^+/K^+-ATP-azei etc.) [318], dar efectele colaterale datorate inhibiției enzimei prezente în alte organe (cu dozele masive de sulfonamide utilizate) are drept urmare faptul că această terapie nu este acceptată pe plan internațional.

În ulcerele complicate cu stenoză piloro-duodenală cu componență funcțională și insuficiență evacuatorie, procentul de vindecare după tratamentul cu Ulcosilvanil depășește 80%. [318]

În afara acetazolamidei, Ulcosilvanilul mai conține bicarbonat de sodiu și potasiu (pentru compensarea pierderilor de astfel de cationi, datorate efectului slab diuretic al drogului), și citrat de sodiu. Aceasta are rolul de a împiedica

Scanned with OKEN Scanner

precipitarea sărurilor de calciu în rinichi, cu formarea de calculi renali. Medicamentul mai conţine mici cantităţi de oxid de Mg(II) şi hidroxid de Al(III), cu rol de antacide.

Deşi procentul de vindecări este deosebit de mare, cu acest medicament care conţine acetazolamidă, ca şi cu majoritatea IAC administraţi sistemic, efectele secundare sunt importante (secţiunea 7.1).

Dispariţia durerii clinice după tratamentul cu Ulcosilvanil, se suprapune cu scăderea tuturor parametrilor secreţiei gastrice acide, bazale şi stimulate maximal cu histamina, insulina, pentagastrina (sau alţi secretagogi) şi cu restabilirea repausului secretor fiziologic în perioadele interdigestive. În cazul în care sindromul dureros de tip ulceros nu dispare, Puşcas şi colab. [328] recomandă creşterea dozei de Ulcosilvanil până la dublarea acesteia. Schemele terapeutice preconizate cu Ulcosilvanil includ administrarea unei doze de atac, pe durata de 10-14 zile, în cantitate de 0,025-0,030 grame acetazolamidă/kg corp/zi, adică 3-6 comprimate de Ulcosilvanil pe zi repartizate în trei prize după masă, şi a unei doze de întreţinere, constând în administrarea a 0,025-0,027 grame acetazolamidă/kg corp/zi (3-4 tablete de Ulcosilvanil pe zi).

În raport cu reactivitatea bolnavului la terapia cu IAC, şi funcţie de evoluţia procesului lezional, este recomandabil a se individualiza strict doza [317,318,328].

Inhibiţia secreţiei gastrice acide cu acetazolamida conţinută în Ulcosilvanil este potenţată de: blocanţii receptorilor β-şi α_2-adrenergici, barbiturice, antidepresive triciclice, carbamazepina ca şi de sărurile de magneziu şi aluminiu [328]. Din contră, administrarea concomitentă sau prealabilă de: histamină, insulină, calciu, iod, anumite antibiotice, antiinflamatoare non-steroidale (în special indometacin) conduce la diminuarea, drastică uneori, a efectului antiulceros al Ulcosilvanilului, [328] datorită efectului activator asupra enzimei al unora dintre aceste medicamente [329].

Efectele indezirabile ale medicamentului (care apar la 7-8% dintre pacienţii trataţi) [328] sunt datorate inhibării AC prezente în alte organe (rinichi, eritrocite, plămâni, SNC etc. – secţiunea 7.1).

Asocierea IAC cu medicamente antiulceroase clasice , permite însă utilizarea unor doze mai mici de Ulcosilvanil, astfel că efectele secundare ale inhibării AC din alte organe, devin mai puţin manifeste [330].

În terapia ulcerelor rezistente la alte terapii medicamentoase, etoxzolamida pare a reprezenta medicaţia de elecţie [331]. O caracteristică a tratamentului cu acest IAC, este aceea că menţine anaciditatea gastrică interdigestivă pentru o lungă perioadă de timp de la întreruperea tratamentului (peste 2 săptămâni), probabil datorită sechestrării drogului în ţesuturile grase ale organismului. Acesta este posibil deoarece etoxzolamida este mult mai liposolubilă, comparativ cu acetazolamida, de unde este eliberată progresiv în timp, inhibând enzima din celula parietală şi după ce drogul nu se mai administrează.

IAC sunt de asemenea utili în prevenirea ulcerelor de stress sau a celor induse de diverşi agenţi farmacologici. Acetazolamidei precum şi altor IAC li se atribuie un efect citoprotector datorită funcţiunilor cu sulf prezente în molecula lor [332].

Scanned with OKEN Scanner

8.3.3 Rolul anhidrazei carbonice în tractul intestinal şi la nivelul glandelor digestive anexe

Sucul intestinal este o soluţie apoasă de electroliţi, cu concentraţie relativ constantă, exceptând ionii de Cl^- şi HCO_3^- a căror concentraţie variază invers proporţional: cea de clorură scade de la duoden la ileon, pe când cea de bicarbonat creşte în acelaşi sens.

pH-ul sucului din bulbul duodenal este de 3,2, pentru a creşte de-a lungul tractului digestiv, atingând valori de 7,0-8,5 la capătul lui, datorită bicarbonatului prezent. Rune [333] a arătat că pH-ul din duoden este determinat de o serie de factori ca de exemplu:

(1) pH-ul gastric (de exemplu, la şobolan, prin expunere prelungită la un pH foarte acid, sub 2, se constată o creştere a secreţiei alcaline a duodenului) [333];

(2) rata evacuării gastrice;

(3) mişcările de propulsie şi retropulsie ale conţinutului duodenal;

(4) secreţia de bicarbonat în pancreas şi duoden.

Pancreasul exocrin secretă bicarbonat (sub influenţa secretinei ca mesager secundar), în debite de până la 145mEq/L. Determinările chimice au demonstrat că sucul pancreatic are o concentraţie de bicarbonat egală cu cea din secreţia biliară, şi de patru ori mai mare decât cea plasmatică (tabelul 58).

Tabelul 58

Compoziţia în electroliţi a unor secreţii digestive

Secreţia	(mM)			
	Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-
Biliară	135	6	105	35
Pancreatică	135 – 143	5 – 9	50	90 – 140
Intestinală	130	10	110	30

În sucul pancreatic, bicarbonatul este generat în celule acinoase şi ductale, prin hidratarea dioxidului de carbon (rezultat din propriul lor metabolism, sau adus de sânge). Reacţia este catalizată de izozima AC II şi se desfăşoară în vecinătatea membranei plasmatice celulare, unde este localizată şi o ATP-ază dependentă de bicarbonat, care generează energia necesară transportului activ al acestui ion. Ionii bicarbonat formaţi sunt apoi excretaţi la polul luminal al celulei, pe când protonul format prin hidratarea CO_2 trece în plasmă. Bicarbonatul este transportat apoi prin transfer activ al HCO_3^- plasmatic prin celula canaliculară, sau prin schimb echimolecular cu Cl^- (în timpul străbaterii canalelor pancreatice).

Prin metode histochimice la nivelul epiteliului mucoasei jejunului, ileonului şi colonului precum şi în capilarele din vecinătatea epiteliului de suprafaţă, a fost evidenţiată AC [324]. În endoteliul capilarelor intestinale este prezentă izozima AC I, pe când în citoplasma celulelor superficiale cea de tip AC II; la nivelul marginii în perie a celulelor intestinale este prezentă izozima AC IV [324]. Nu se cunosc până în prezent mecanismele de transport ale ionului de bicarbonat în interiorul enterocitelor, dar prezenţa acestuia a fost detectată în zonele bazale şi laterale ale acestor celule, precum şi în interstiţiile dintre ele [334]. Activitatea

Scanned with OKEN Scanner

enzimei din această parte a tractului gastro-intestinal este mult redusă, comparativ cu cea din segmentele superioare (stomac, duoden, pancreas etc.). Acest fapt se corelează cu scăderea concentrației de bicarbonat, dinspre duoden spre ileon. Inhibitorii de tip sulfonamidic reduc secreția de bicarbonat în aceste organe, dar nu o abolesc, astfel încât utilizarea lor în scop terapeutic este limitată în aceste segmente ale tractului digestiv.

8.4. Tratamentul glaucomului cu inhibitori ai anhidrazei carbonice

Glaucomul reprezintă starea patologică oculară caracterizată prin creşterea presiunii intraoculare (PIO). Boala este una dintre cauzele cele mai importante de orbire ale populației adulte; maladia afectează aproximativ 3% din populația țărilor europene şi Americii de Nord [335].

Creşterea PIO peste limitele fiziologice (de 10-22 mmHg) [335] antrenează pe cale ischemică atrofia progresivă a nervului optic, având drept consecvență orbirea. Glaucomul primar poate fi simplu (denumit şi glaucom cronic simplu sau glaucom cu unghi deschis) sau congestiv (glaucom cu unghi închis), care la rândul său poate fi inflamator sau cu acces de glaucom. Este de asemenea descris şi glaucomul secundar [335].

PIO creşte ca urmare a hipersecreției de umoare apoasă sau prin tulburarea excreției acesteia, procese în care AC (izozimele AC II şi AC IV) intervin în mod notabil [16,17,335] (secțiunea 7.1 şi 7.2).

Formarea umorii apoase este un proces activ care are loc la nivelul corpului ciliar, iar scurgerea acesteia se realizează fie prin spațiul trabecular din unghiul irido-corneean, către canalul Schlemm, fie prin extragerea osmotică a apei din umoarea apoasă. Umoarea apoasă este dispusă în camera anterioară, cu un volum de 200 µL. Compoziția în electroliți a umorilor camerelor ochiului este redată în tabelul 59 [16].

Tabelul 59

Compoziția ionică a umorii apoase în comparație cu plasma [16]

Fluid din	(mM)			
	Cl^-	HCO_3^-	Na^+	ascorbat
Plasmă	112	24	143	0,02
Camera anterioară	105	28	147	0,96
Camera posterioară	100	34	145	1,30

Din datele tabelului 59 reiese că umoarea camerei posterioare vitroasă este hipertonică în bicarbonat comparativ cu plasma. De asemenea, corpul vitros are concentrație mai mare de ascorbat în timp ce ionii clorură se găsesc în cantitate mai mică comparativ cu concentrația din umoarea apoasă.

Mecanismele fiziologice de producere a umorii apoase în camera anterioară includ:

(1) secreția activă la nivelul celulelor epiteliale nepigmentare ale proceselor ciliare (fig. 28);

Scanned with OKEN Scanner

(2) ultrafiltrarea plasmei;

(3) difuzia şi trecerea din camera posterioară în camera anterioară. Această dinamică a umorii apoase este cea care generează variaţiile PIO [16].

Rata secreţiei umorii apoase variază cu specia, fiind la om de 2 µL pe minut în timp ce la iepure este de 3–5 µL pe minut [16].

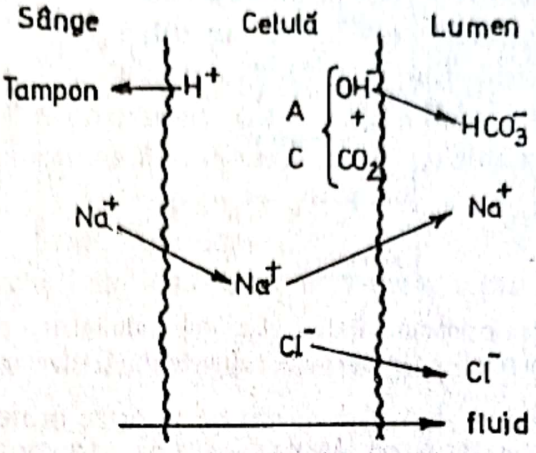


Fig. 28. O schemă simplificată a formării bicarbonatului în umoarea apoasă (valabilă însă şi pentru pancreas, fluidul cerebrospinal şi alte ţesuturi) [154b].

Enzimele cele mai importante implicate în formarea umorii apoase sunt AC (izolată în ochi Wistrand, în 1951) [12] şi Na^+/K^+-ATP-aza [335]. În producerea umorii apoase sunt implicate izozimele AC II şi AC IV (secţiunea 2.1.4), sensibile la inhibiţia cu sulfonamide (secţiunea 4.2) [16,17,154,155,335].

Utilizarea inhibiţiei AC din ochi ca terapie a glaucomului a fost postulată de Friedenwald [11] în 1949 şi demonstrată experimental prin studiile lui Maren şi colab., în perioada 1950-1955 [15,16,154, 155,303]. Practic, inhibitorii sistemici (de tipul acetazolamidei, methazolamidei etc.) sunt utilizaţi în practica medicală ca antiglaucomatoase de peste 40 de ani cu rezultate excelente, datorită eficacităţii acestor droguri în a micşora PIO elevată, şi relativei lor netoxicităţi [16,154]. În terapia glaucomului, inhibitorii anhidrazei carbonice pot fi utilizaţi în conjuncţie cu alte forme de tratament medicamentos sau cu cel chirurgical [335].

Administrarea preparatelor pe bază de IAC se poate face pe cale generală (sistemică) sau topică (secţiunea 7). Indiferent de modul de administrare, locul de acţiune al acestor agenţi farmacologici este ochiul, unde inhibă AC implicată în secreţia umorii apoase [16, 335]. Acţiunea IAC de reducere a PIO este independentă de efectul diuretic al acestora şi de inhibiţia AC din rinichi [16].

Administrarea de acetazolamidă (tablete sau capsule) sau metazolamidă, în dozele prezente în fig. 29 A-C produce scăderea PIO la aproximativ 20-90 minute de la administrarea *per os*, maximul efectului terapeutic atingându-se la 3–5 ore. Durata menţinerii efectului este de 4–8 ore [16,336].

Diclorofenamida îşi instalează efectul antiglaucomatos după o oră, menţinându-şi-l aproximativ 10 ore [16]. Dozele orale de 500 mg acetazolamidă induc la 30–40% din cazurile tratate, reduceri rapide ale PIO cu 7–10 mmHg (tabel 60).

Scanned with OKEN Scanner

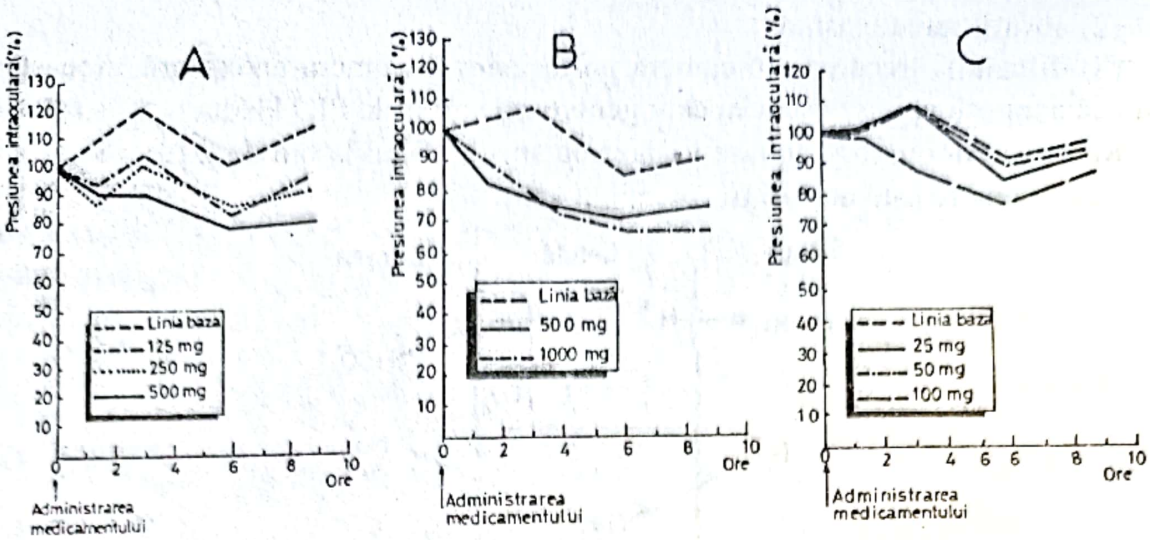


Fig. 29 A,B,C. Schimbări ale presiunii intraoculare după administrarea orală de IAC sistemici: A - tablete de acetazolamidă; B - capsule de acetazolamidă; C - tablete de metazolamidă [16].

Acelaşi efect al metazolamidei se obţine la doze orale de 100 mg, când PIO se reduce cu valori de până la 8–9 mmHg [16].

Tabelul 60

Efectul acetazolamidei asupra presiunii intraoculare (PIO) şi dinamicii umorii apoase (exprimată ca debit de curgere) la subiecţii normali şi cu glaucom

Subiecţi investigaţi	PIO (mmHg)	Debit de curgere (µL/min/mmHg)
Normali	17,2	0,25
+ acetazolamidă	12,9	0,25
Cu glaucom cu unghi deschis	52	0,072
+ acetazolamidă	26	0,065
Cu glaucom secundar	54	0,085
+ acetazolamidă	23	0,090

În urma inhibiţiei AC prin administrarea de acetazolamidă compoziţia umorii apoase se modifică (tabel 61). Cele mai importante modificări vizează concentraţia ionilor de bicarbonat, care scade în camera anterioară şi cea posterioară a ochiului, fără a se modifica semnificativ nivelul bicarbonatului plasmatic [154b].

Administrarea locală de acetazolamidă în glaucomul cu unghi deschis se face spaţiat, câte 125 mg la 12 ore. În funcţie de rezultatul tratamentului, doza se poate creşte până la 250 mg/12 ore [16,335].

Pentru cazurile în care acetazolamida singură nu reuşeşte micşorarea PIO, se poate asocia tratamentului clasic cu pilocarpină [335].

În tratamentul glaucomului acut congestiv, acetazolamida se injectează (ca sare de sodiu) lent intravenos, la doze de 0,5-1,0 g, diluată în 10 mL apă distilată [16, 335].

Metazolamida se administrează pentru tratamentul glaucomului cronic în doze orale de 50–100 mg la 8–12 ore. Etoxzolamida se administrează iniţial în doze de 125 mg la fiecare 6 ore, *per os*, pentru a se reduce ulterior doza la aceeaşi cantitate administrată doar o dată pe zi [16]. În cazul tratamentului glaucomului

Scanned with OKEN Scanner

cronic cu etoxzolamidă doza inițială este de 100–200 mg/12 ore, pentru a se reduce apoi la 25–50 mg de 1–3 ori/zi [16].

Efectele secundare ale IAC sistemici (secțiunea 7.1.) sunt menținute și în cazul tratamentului glaucomului, însă acestea sunt mult mai reduse ca incidență și intensitate, sau nu apar deloc în cazul inhibitorilor topici, dezvoltați în ultima perioada (secțiunea 5.2.1. – pentru partea de sinteză chimică a acestor IAC, și secțiunea 7.2. – pentru partea de farmacologie și studii clinice pe om).

IAC în tratamentul glaucomului, sunt contraindicați în următoarele situații:

– administrarea simultană de pilocarpină sau la bolnavi care prezintă leziuni hepatice și/sau renale;

– hipersensibilitate la sulfonamide;

– pacienți care au utilizat sistematic corticosteroizi, digitalice sau diuretice tiazidice;

– bolnavi care au utilizat doze mari de aspirină sau alte inflamatoare nesteroidiene.

IAC au un loc binemeritat în oftalmologie pentru terapia diferitelor forme de glaucom. Prin apariția compușilor cu acțiune topică, probabil că rolul acestor agenți farmacologici va crește. Tratamentul cu IAC încetinește evoluția bolii spre orbire, prelungind viața socială a pacientului, aceasta deoarece efectele secundare în cazul utilizării AC sunt constant mai reduse în cazul administrării locale și, oricum, nu cu mult mai neplăcute, în cazul administrării orale, decât cele ale altor medicamente antiglaucomatoase [335].

8.5. Utilizarea inhibitorilor anhidrazei carbonice în epilepsie

Epilepsia (*morbus sacer*) este o boală care impresionează prin brutalitatea și dramatismul crizelor sale paroxistice, însoțite de tulburări profunde ale unor funcții cerebrale (motorii, senzoriale, vegetative, psihice) și a conștiinței [293]. În rândul populației adulte are o incidență de 0,5 %, dar este mult mai frecventă la copii. Boala are o etiopatogenie incertă, iar tratamentul este cel mai adesea paleativ [293]. Tratamentul medicamentos al epilepsiei urmărește încetarea sau spațierea crizelor epileptice [293].

IAC au fost introduși în tratamentul epilepsiei de către Woodbury, care a determinat și mecanismul lor (prezumtiv) de acțiune [293].

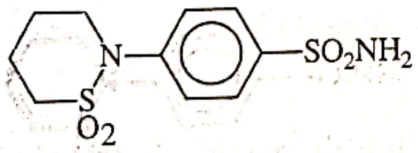
Prin inhibiția AC din SNC și vasele cerebrale, inhibitorii de tipul acetazolamidei produc o creștere a fluxului sanguin cerebral, [337,338] însoțită de creșterea presiunii parțiale a CO_2 și a concentrației acestuia în celula nervoasă. Pe de altă parte influxul intracelular de Na^+ scade, astfel că raportul $[Na^+]$ intracelular/$[Na^+]$extracelular descrește, pe când raportul $[K^+]$intracelular/ $[K^+]$extracelular crește. Rezultatul este că potențialul de repaus al membranelor crește, iar acestea se stabilizează; neuronii devin astfel mai puțin excitabili, iar pragul lor de excitabilitate este crescut [293]. Pe lângă acțiunea la nivel neuronal, IAC inhibă anhidraza carbonică și din celulele gliale, mai ales din cele diencefalice.

Scanned with OKEN Scanner

Deprimând în mod selectiv căile monosinaptice, IAC administrați în epilepsie, protejează împotriva crizelor audiogene şi a celor produse prin deprivare de concentrații mari de CO_2 în măduva spinării (mai precis, în fluidul cerebrospinal). IAC cresc pragul de stimulare al structurilor diencefalice prin acumulare de CO_2 şi reducerea influxului celular glial al ionilor de sodiu [16,293].

IAC, precum acetazolamida şi metazolamida, se înscriu printre antiepilepticele de ordinul doi (M2), fiind medicamente care au o eficiență sporită prin asociere cu antiepileptice de ordinul I (M1). În cazul unor astfel de asocieri, trebuie însă avut în vedere faptul, că prin efectul diuretic al IAC, de multe ori eliminarea renală a antiepilepticului M1 creşte. Acetazolamida este utilă, în special, în tratamentul crizelor majore, a crizelor epileptice catameniale, dar şi în formele de *petit mal* sau la copiii encefalopați care au hipertensiune intercraniană, la oligofrenici epileptici, cărora le diminuează emotivitatea exagerată şi agresivitatea. Medicamentul se recomandă mai ales la pacienții care nu răspund la etosuximida [293, 339]. Acetazolamida reduce faza tonică a convulsiilor declanşate prin electroşoc transcerebral, deprimă convulsiile provocate de pentametilen-tetrazol (pentetrazol), creşte pragul răspunsului cerebral la stimularea electrică [293].

Un alt inhibitor al AC, sultiamul [perhidro-2-(4-sulfamoil-fenil)-2-tiazin-1,1-dioxidul], este utilizat ca antiepileptic în clinică, fiind al cincilea IAC sistemic, după acetazolamidă, metazolamidă, etoxazolamidă şi diclorofenamidă.



Sultiam

Efectul terapeutic clinic al acestui derivat de sulfanilamidă constă în deprimarea fazei tonice a convulsiilor induse prin electroşoc. De asemenea, la doze mari sultiamul deprimă şi faza tonică a convulsiilor produse de pentetrazol [339]. Acțiunea antiepileptică a sultiamului este superioară celei a difenilhidantoinei, drogul având o acumulare accentuată în SNC. Studii clinice au demonstrat că doza de 200 mg produce inhibiția a 14% din AC eritrocitară şi de 50 % a AC din SNC [293,339].

Ca şi în cazul acetazolamidei şi pentru sultiam se observă apariția toleranței în cursul tratamentului îndelungat, efect neexplicat până în prezent [293].

Dozele terapeutice în cazul bolnavilor epileptici pentru acetazolamidă se suprapun cu cele utilizate pentru obținerea efectului diuretic. În cazul sultiamului se utilizează doze orale de 200 mg, de trei ori pe zi. Ca şi acetazolamida, sultiamul nu se metabolizează, fiind eliminat ca atare prin filtrul renal.

Studii clinice recente recomandă utilizarea IAC şi în tratamentul schizofreniei. Astfel, tratamentul cu acetazolamidă (2g/zi) şi tiamină (1,5g/zi) conduce la ameliorări foarte bune ale pacienților schizofrenici, fără a se observa efecte secundare semnificative la tratamente de durată (3 ani) [340].

Scanned with OKEN Scanner

8.6. Utilizarea inhibitorilor anhidrazei carbonice în terapia răului de altitudine şi mişcare

Insuficienţa respiratorie este un complex etiopatogenic morbid, caracterizat prin perturbarea concentraţiei gazelor din sângele arterial sistemic. Acest fenomen poate surveni şi prin diminuarea presiunii parţiale a oxigenului din aerul inspirat, datorită scăderii barometrice (la altitudine elevată), sau prin diminuarea fracţiei de oxigen din aer, prin vicierea acestuia cu gaze străine.

Răul de altitudine, caracterizat prin instalarea unei hipoxemii, este deci o insuficienţă respiratorie. Simptomele bolii variază cu gradul de severitate al hipoxiei, şi constau în: cefalee, insomnie, greaţă, vomă, ameţeli, astenie etc. În formele severe pot apare sindroame neurologice ca: ataxie, stupoare, dezorientare spaţială, edem cerebral.

Studii experimentale au demonstrat că toleranţa la altitudine poate fi mărită prin inhibarea AC [294,341]. Astfel, administrarea de sulfanilamidă la iepure (până la concentraţii plasmatice de 1mM) a condus la tolerarea depresiunii adiţionale produsă de o altitudine de 1000m, iar la câine, administrarea de 100 mg/kg corp de acetazolamidă, a condus la creşterea pO_2 în sângele animalelor tratate, cu 7 mmHg, în condiţii ambientale de concentraţie redusă a acestui gaz [294,337,341].

Efectul terapeutic al IAC în răul de altitudine se pare că este datorat creşterii rezervelor de CO_2 din organism (ca urmare a inhibării enzimei), ceea ce contracarează eliminarea uzuală a acestuia în timpul hipoxiei. Se induce astfel o ventilare crescută, asociată cu scăderea pCO_2 în alveolele pulmonare. Efectul este creşterea presiunii parţiale a O_2 în sânge [294,341]. De menţionat că la indivizii sănătoşi în condiţii de mediu normale sub aspectul compoziţiei aerului atmosferic, hiperventilaţia nu conduce la o bună ventilare a creierului. Situaţia este însă diferită pentru cazurile de rău de altitudine; mai mult, prin inhibiţia AC nu se constată creşterea nivelului de lactat în plasmă [294].

Acetazolamida induce o hiperventilaţie moderată, presiunea parţială a CO_2 descrescând gradual după 10 zile de tratament la 70 % din valoarea de control, hematocritul reducându-se cu până la 10% [338].

Acţiunea benefică a IAC în răul de altitudine se bazează pe interferenţa cu mecanismele de variaţie a presiunii parţiale a diverselor gaze din sânge [294], pe procesul de disociere a oxi-Hb şi pe efectul lor acidotic [294].

În figura 30A este redată variaţia fluxului cerebral sangvin (la om) după administrarea a 1 g acetazolamidă/zi, timp de 10 zile, iar în figura 30B variaţia corespunzătoare a presiunii parţiale a dioxidului de carbon, după acelaşi tratament [338].

Studii clinice de rheo-encefalografie cerebrală au arătat că fluxul sangvin intracranian creşte cu 38% după administrarea unei singure doze de 1 g acetazolamidă. Efectul nu este însă de durată întrucât dispare în mare măsură după două zile de tratament datorită mecanismelor de compensare de tipul celor observate la inhibiţia enzimei din rinichi (secţiunea 8.2.). Totuşi efectul benefic al terapiei cu IAC în răul

Scanned with OKEN Scanner

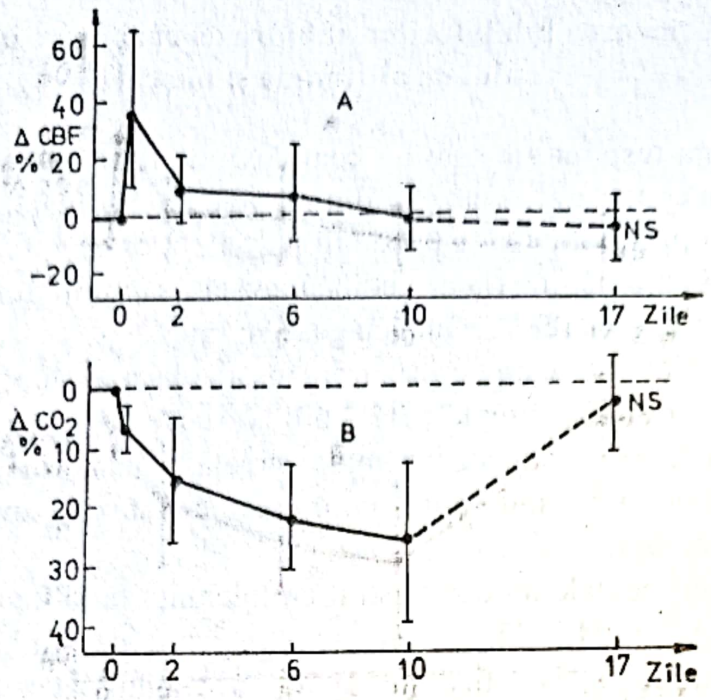


Fig. 30. Variația fluxului sanguin cerebral (ΔCBF) (A) și a conținutului alveolar de CO_2 (ΔCO_2, %) (B) după administrarea timp de 10 zile a câte 1g acetazolamidă.

de altitudine este deosebit, mai ales că în multe cazuri această afecțiune nu este de durată și tratamentul nu durează mai mult de câteva zile [294].

S-a postulat, de asemenea, că tratamentul cu IAC ar putea suprima răul de mișcare spațială observat la 50-80 % dintre cosmonauți [342]. Conform teoriilor existente, acesta s-ar produce datorită mișcării fluidelor din corpul rostral în condiții de imponderabilitate, care ar genera răul de mișcare prin efecte asupra canalelor semicirculare și otolitelor [343] (teoria este denumită „a mișcării fluidelor") [343] sau, prin „teoria conflictelor senzoriale" [344], conform căreia răul de mișcare rezultă dintr-o nepotrivire a semnalelor senzoriale provenind din organele vestibulare, statice, oculare și proprioceptive. Compușii de tipul IAC, care suprimă formarea fluidului cerebrospinal [16], a secreției umorii apoase [16], probabil că diminuează de asemenea formarea perilimfei în canalele semicirculare ale urechii interne, astfel încât ar diminua mișcarea fluidelor din aceste organe, ameliorând astfel răul de mișcare (în cazul în care teoria mișcării fluidelor este adevărată). Din datele publicate până în prezent nu reiese clar dacă această ipoteză a lui Martin [342] a fost verificată.

8.7. Inhibitorii anhidrazei carbonice și substanța osoasă

AC este o enzimă distribuită în aproape toate țesuturile [16], inclusiv la nivelul țesutului osos, unde a fost pusă în evidență de Gay și Mueller [345] la concentrații comparabile cu cele din celulele renale. Izozima (AC II) este prezentă doar în osteoclaste [346, 347] unde se pare că joacă rolul cel mai important în procesele de resorbție osoasă [346], atât în condiții fiziologice, cât și patologice. Rolul izozimei AC II în osteoclaste este de a furniza ioni de H^+ (prin hidratarea CO_2), necesari pentru declanșarea și întreținerea activității hidrolazelor acide

lizozomale [348], cât şi a proceselor de dizolvare a constituenţilor minerali ai osului. În metabolismul mineral osos, protonii sunt implicaţi în transformarea fosfatului terţiar de calciu (insolubil) în fosfaţi acizi (primar şi secundar), solubili în apă [346, 348-350]. În astfel de procese par a fi implicaţi şi alţi factori, produşi de osteoblaste, dar a căror natură chimică nu a fost identificată deocamdată [348–350].

În organismul mamiferelor există o corelaţie strânsă între activitatea AC, activitatea hormonilor mineralotropi (parathormon (PTH), calcitonină, somatotrophormon etc.), vitamina D şi homeostazia calciului (şi indirect inclusiv cea a fosforului) [348–350].

Hunter şi colab. [351] au demonstrat efectele inhibiţiei AC din osteoclastele de pui prin folosirea acetazolamidei, calcitoninei şi efectele inverse ale PTH, care se pare că activează enzima. Raisz şi colab. [352] au studiat comportarea anhidrazei carbonice din osteoclastele de şobolan cu diferite sulfonamide IAC (acetazolamidă, etoxzolamidă, derivaţi de tiofen-2-sulfonamidă), precum şi în prezenţa altor agenţi, de genul PTH, prostaglandinei E_2 (PGE_2), 1,25-dihidroxivitaminei D, interleukinei-1 (IL-1) etc. Atât, PTH cât şi dihidroxivitamina D se pare că au un efect activator asupra AC, stimulând resorbţia osoasă [350–352]. PTH influenţează de asemenea procesele de transformare ale osteoblastelor în osteoclaste [352], precum şi nivelul concentraţiilor intracelulare de *c*-AMP, care probabil că este activatorul enzimei.

Drewe şi colab. [350] au demonstrat ca nivelul seric al ionului de Ca^{2+} se corelează invers proporţional cu activitatea izozimei AC II din osteoclaste. Mecanismele fiziologice şi biochimice prin care se produce această reglare au fost demonstrate de către Drewe şi colab., precum şi de Kenny şi colab [346, 348]. Astfel, activarea AC este precedată de creşterea concentraţiilor intracelulare de *c*-AMP şi de activarea proteinkinazei *c*-AMP-dependente. Administrându-se acetazolamidă şobolanilor de experienţă normali şi paratiroidectomizaţi, s-a demonstrat că inhibitorul enzimei conduce la inhibiţia răspunsului hipercalcemic, la PTH sau la dibutiril-*c*-AMP. În paralel, acetazolamida produce creşterea eliminărilor urinare de fosfat şi bicarbonat, efect asemănator cu cel observat după administrarea de parathormon. Iniţial, se credea că acizii necesari mobilizării calciului din os sunt acizi organici (lactic, citric etc.), dar astfel de studii [345–352] cu IAC, au dovedit rolul direct al enzimei în aceste procese. În prezent sunt admise două teorii privind mobilizarea calciului din oase:

a) prima implică AC care generează H^+, catalizând reacţia de hidratare a CO_2 în osteoclaste, care apoi sunt utilizaţi pentru mobilizarea mineralelor insolubile [348–350];

b) cea de-a doua teorie atribuie anhidrazei carbonice, un rol secundar. Astfel, acidifierea în compartimentele resorbtive ale osului, este realizată de o H^+-ATP-ază care translochează protonii [353]. Izozimei AC II îi revine rolul de a tampona ionul HO^- format prin proteoliza apei (sub influenţa ATP-azei), prin reacţia acestuia în citoplasmă cu CO_2, urmată de transportul ionului bicarbonat prin plasmă. Actualmente există date pro şi contra ambelor teorii; important este însă faptul că implicarea AC în aceste procese se poate exploata terapeutic.

Scanned with OKEN Scanner

Înainte de a trece la aplicațiile IAC în tratamentul osteoporozei, reamintim că relativ recent, grupul lui Sly [28, 53] a descris un sindrom de osteopetroză, asociată cu acidoza tubulară renală şi calcifieri cerebrale. Sindromul s-a demonstrat că se datorează deficienței de izozimă AC II, boală genetică autozomală recesivă. Această descoperire a evidențiat încă o dată rolul pe care această enzimă (şi inhibiția sa) îl joacă în substanța osoasă. Studiile experimentale au demonstrat că şi calcitonina, hormon oligopeptidic implicat în procesele de osificare, este un inhibitor al AC [354]. Inhibiția AC din osteoclaste de către calcitonină ar putea reprezenta mecanismul prin care se explică efectele hipocalcemice ale acestui hormon [350, 355].

În patologia umană, inhibiția AC din osteoclaste este utilă în prevenirea şi tratamentul osteoporozei [348, 355], şi în tratamentul hipercalcemiei maligne, unde reduce valorile concentrației ionilor de Ca^{2+} seric, prin diminuarea resorbției osoase osteoclastice [348, 356].

Osteoporoza apare în special la femei la menopauză, având o etiologie complexă, care implică schimbări ale țesutului osos şi extraosos, precum şi ale funcțiilor endocrine. Rezultatul acestora constă într-o neconcordanță a vitezelor de formare şi resorbție a osului, cu imposibilitatea reparării microfisurilor osoase apărute o dată cu vârsta, şi într-o pierdere importantă a competenței mecanice a osului [355]. Una dintre abordările terapeutice în tratamentul osteoporozei constă în inhibiția AC osteoclastice, care s-a arătat că este sensibilă la inhibitori de tip sulfonamidic [348, 350]. Acetazolamida şi metazolamida s-au dovedit eficace în studii pe termen lung (peste 4 ani) [355] în a preveni mobilizarea calciului din os, cu consecințe benefice pentru terapia sindromului. Studiile clinice au reliefat că efectul benefic nu se observă în administrările pe termen scurt (0–2 ani), acesta instalându-se în timp. În prezent nu sunt cunoscuți IAC cu acțiune specifică numai asupra enzimei din osteoclaste, deşi aceştia ar fi deosebit de utili în astfel de tratamente [355]. Unii dintre inhibitorii complecşi (secțiunea 6), ca de exemplu complecşii acetazolamidei, metazolamidei sau etoxzolamidei cu lantanide, Mg(II), Al(III) etc. [270–275], ar putea prezenta aplicabilitate în astfel de tratamente, datorită inhibiției deosebite asupra izozimei AC II, şi faptului că în molecula lor sunt prezenți ioni metalici care interferă *in vivo* cu ionul de calciu [284].

În osteoporoză, IAC se administrează în tratament de durată (2–4 ani), la doze de 125–500 mg/zi în cazul acetazolamidei, şi respectiv 25–50 mg/zi, pentru metazolamidă [355].

În hipercalcemia malignă s-a constatat o intensificare a activității osteoclastelor, precum şi o resorbție osoasă puternică, însoțită de suprimarea formării osoase. Astfel de fenomene sunt deosebit de frecvente la tumorile maligne care dau metastaze osoase (prostată, sân, pulmon etc.) [356]. Administrarea de acetazolamidă (10mg/oră, timp de 10 ore) unor şobolani cu tumori interesând celulele Leydig H500, a condus la scăderi semnificative ale nivelului calcemiei, de la 14,2 mg/L la 11,5 mg Ca^{2+}/L [356]. Întrucât posedă proprietatea de a limita procesele de resorbție osoasă, IAC pot fi utilizați clinic în acest scop, posibilitate terapeutică puțin explorată în metastazele osoase maligne.

Scanned with OKEN Scanner

Şi pentru o astfel de indicaţie terapeutică se simte nevoia design-ului unor inhibitori specifici pentru enzima din osteoclaste, care să conducă la obţinerea de medicamente fără efecte secundare deosebite. După cum s-a arătat însă în secţiunea 5.4., actualmente sunt raportaţi puţini IAC specifici pentru diferitele izozime, sau selectivi pentru anumite ţesuturi în care enzima este prezentă [241].

8.8. Utilizarea inhibitorilor anhidrazei carbonice radiomarcaţi în explorări paraclinice

Deşi costisitoare sub aspectul aparaturii, probele de investigaţie paraclinică utilizând radio-izotopi sunt tot mai frecvent aplicate, datorită comodităţii, preciziei şi bogăţiei de informaţii pe care le aduc [357]. Radiomarcarea eritrocitelor prezintă aplicaţii în medicina nucleară pentru studiul mecanicii circulatorii a sângelui, analiza maladiilor cardio-vasculare, detectarea hemangioamelor şi a hemoragiilor gastrointestinale [358–360].

Pentru radiomarcarea selectivă a unui anumit tip de celule se poate utiliza proprietatea de formare a complecşilor enzimă-inhibitor, considerând o enzimă care să fie suficient de abundentă în ţesutul respectiv, şi un radio-ligand, cu proprietăţi de inhibitor al enzimei respective [187, 358–360]. Deşi astfel de abordări au fost utilizate în marcarea dihidrofolat-reductazei (în aspectul imagistic al tumorilor), 11-β-hidroxilazei (pentru localizarea cortexului adrenal); sau acetilcolinesterazei (pentru marcarea eritrocitelor ori a diverselor compartimente ale inimii) [187, 357], rezultatele au fost modeste. Aceasta s-a datorat în special concentraţiilor reduse ale enzimelor avute în vedere în ţesuturile ţintă. Situaţia pare a se schimba, în cazul folosirii AC, enzima deosebit de răspândită în eritrocite, unde cele două izozime AC I şi AC II, ating concentraţii de 130–200 μM [16, 187].

Întrucât IAC manifestă o afinitate deosebită pentru izozimele eritrocitare, pot fi utilizate ca agenţi deosebit de promiţători pentru dezvoltarea unor tehnici de investigaţie paraclinică de tipul celor deja menţionate. În acelaşi scop pledează şi valorile constantelor de disociere ale complecşilor enzimă-inhibitor de acest tip, care sunt de ordinul de mărime 10^{-6}–10^{-9} M (secţiunile 4.2. şi 5).

Recent, prin studiile lor, Singh şi colab. [187, 359, 360] au elaborat metodologia utilizării unor sulfonamide aromatice radioactive pentru marcarea selectivă a eritrocitelor, atât pentru modele *in vitro*, cât şi pentru cele *in vivo*, pe şobolan sau la om.

Astfel, radiomarcarea cu ^{125}I a 4-iodo-benzensulfonamidei obţinută prin reacţii de schimb izotopic, dintre sulfonamida neradioactivă şi radioiod, a condus la un agent de radiomarcare cu o afinitate relativ bună pentru cele două izozime din eritrocitele umane $K_I = 4 \cdot 10^{-6}$ M pentru AC I, şi respectiv 10^{-7} M pentru AC II [359]. Studiile cu acest agent au fost experimentate prin administrare intravenoasă la şobolani, şi unor voluntari umani [360]. Pentru şobolan s-a constatat că radioactivitatea se concentrează la nivelul sângelui şi al intestinului gros (10% din radioactivitate administrată), iar timpul de înjumătăţire al drogului, la eliminare este de 69±2,7 ore.

Scanned with OKEN Scanner

La om nu s-a constatat concentrarea la nivelul tractului gastro-intestinal; întreaga radioactivitate fiind prezentă numai în sânge. Timpul de înjumătățire, la eliminare a fost de 9,8±1,5 zile [360]. Autorii [187] au sintetizat de asemenea un număr important de sulfonamide aromatice, de tipul **5** (secțiunea 5.1.1, tabelul 17), conținând atomi de halogen legați direct de inelul benzenic sau în resturi de tip halogeno-acetamido. Compușii s-au dovedit a fi IAC foarte potenți pentru izozimele AC I și AC II, unii dintre ei producând și inactivarea ireversibilă a acestora (efect nedorit) prin reacția atomului de halogen cu resturi de aminoacizi din situsul activ al enzimelor. În acest fel se poate produce o marcare specifică a eritrocitelor, cu consecința dezvoltării acestor agenți pentru explorările paraclinice din patologia umană.

8.9. Benzotiazidele și diureticele de ansă ca inhibitori ai anhidrazei carbonice

Aceste două clase de diuretice, larg utilizate în terapeutica umană (hipertensiune arterială, edeme ale diferitelor afecțiuni cardiace, hepatice sau renale, diabet insipid, hipercalciurie, edeme pulmonare, insuficiența renală cronică etc.) [154a, 290] au fost descoperite după 1960, cu prilejul cercetării a noi IAC cu acțiune selectivă și de durată, ca diuretice. Astfel, examinându-se derivații de benzensulfonamidă (secțiunea 5.1.3.), s-a costatat că diureza acestora este complet diferită de cea observată după administrarea de IAC de tipul acetazolamidei (secțiunea 5.1.), în special pentru pronunțatul lor efect cloruretic [208]. S-a dovedit ulterior că tiazidele diuretice măresc excreția de NaCl și apă, inhibând mecanismele de transport electroneutru ale ionilor de Na^+ și Cl^- prin celulele tubului contort distal [208, 361]. În plus, secreția ionului de K^+ este stimulată, posibil ca urmare a creșterii fluxului fluidului secretat în tubul contort distal.

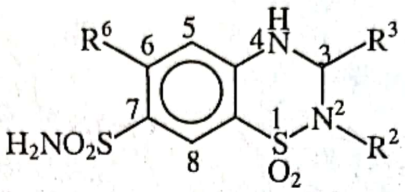
Absorbția ionilor de Ca^{2+} pe de altă parte este stimulată, probabil prin descreșterea secreției ionului de Na^+ în tubul contort distal și creșterea schimbului ionic sodiu/calciu în zona bazo-laterală a celulelor tubulare. Tiazidele diuretice posedă în molecula lor grupări sulfonamidice nesubstituite, astfel că au efect de inhibare al AC (tabelul 62). Acest efect este însă în general slab, exceptând diclorfenamida, care este un IAC relativ puternic. Acțiunea pare a fi cauzată de prezența substituenților din poziția *orto* față de gruparea SO_2NH_2. Studiile de histochimie au arătat că pentru izozima AC I, chiar sulfonamidele aromatice *orto*-substituite (față de această grupare) au prezentat inhibiții mai puternice, comparativ cu datele pentru izozima AC II [17]. Din acest motiv, ar fi interesant de studiat efectul inhibitor al tiazidelor saluretice asupra acestei izozime și nu cum se efectuează, în mod uzual, pe enzima eritrocitară nepurificată (amestec de AC I + AC II). Deși, efectul diuretic al benzotiazidelor nu se datorează în primul rând acțiunii lor de IAC, inhibiția enzimei renale contribuie la obținerea unei diureze sporite, fiind un tampon de rezervă al capacităților de transport de la nivelul ansei lui Henle [361].

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul 61 sunt prezentaţi principalii compuşi utilizaţi clinic, datele de inhibiţie a AC eritrocitare umane [16, 290], doza farmacologică utilizată pentru obţinerea efectului diuretic optim la om, precum şi durata de acţiune a acestuia.

Tabelul 61

Tiazide cloruretice utilizate clinic: date de inhibiţie a AC eritrocitare umane, doza diurerică la om şi durata de acţiune (se redau pentru comparaţie şi datele acetazolamidei şi diclorofenamidei).



Agent	R^2	R^3	R^6	IC_{50} (μM)	Doza (mg/zi)	T^a (ore)
Clorotiazida[b]	H	H	Cl	2	500–2000	6–12
Hidroclorotiazida	H	H	Cl	20	25–100	6–12
Hidroflumetiazida	H	H	CF_3	200	25–200	6–12
Bendroflumetiazida	H	Ph CH_2	CF_3	300	2,5–15	6–12
Benztiazida[b]	H	$PhCH_2SCH_2$	Cl	0,1	50–200	6–12
Triclorometiazida	H	$CHCl_2$	Cl	60	1–4	24
Meticlotiazida	Me	CH_2Cl	Cl	–	2,5-10	24
Politiazida	Me	$CH_2SCH_2CF_3$	Cl	0,5	1–4	24–48
Quinetazona	–	–	–	–	50–200	18–24
Metolazona	–	–	–	50	2,5–20	12–24
Clortanidona	–	–	–	0,3	25–200	24–72
Indopamida	–	–	–	–	2,5–5	24–36
Diclorofenamida	–	–	–	0,07	200	12
Acetazolamida	–	–	–	0,01	250–375	–

[a] Durata de acţiune a efectului diuretic (în ore).
[b] Legătura dublă între C^3 şi N^4.

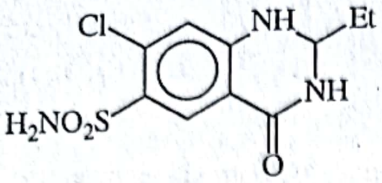
După cum se observă din datele tabelului 61, eficacitatea ca IAC a derivaţilor benzotiazidici nu este afectată de natura grupării din poziţia 6 (astfel, derivaţii posedând resturi CF_3 au o valoare pK_a micşorată comparativ cu cei posedând clor în această poziţie).

În afara compuşilor aparţinând familiei clasice a benzotiazidei există compuşi care sunt deosebit de eficace ca şi diureticele cloruretice, deşi nu aparţin acestei clase.

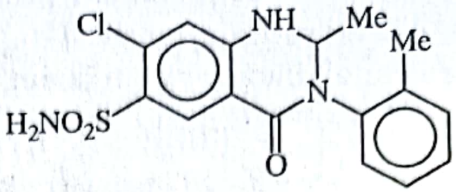
Diureticele de ansă numite şi diureticele de plafon înalt, au fost descoperite în cercetările legate de benzotiazide [154a, 362, 363]. Termenul de diuretice de plafon înalt este motivat ca utilizare, deoarece aceşti compuşi au o acţiune distinctivă asupra funcţiei tubulare renale, întrucât induc o diureză maximă mult mai puternică, în comparaţie cu cea observată cu alte clase de diuretice.

Deoarece şi aceşti compuşi posedă grupări sulfonamidice nesubstituite, pot fi consideraţi ca fiind IAC, dar ca şi în cazul tiazidelor, efectele de inhibiţie ale enzimei sunt slabe.

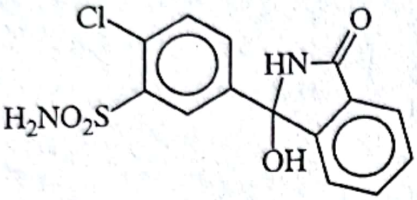
Scanned with OKEN Scanner



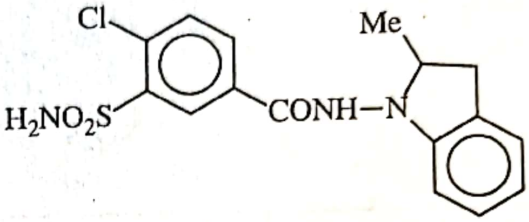
Quinetazona



Metolazona

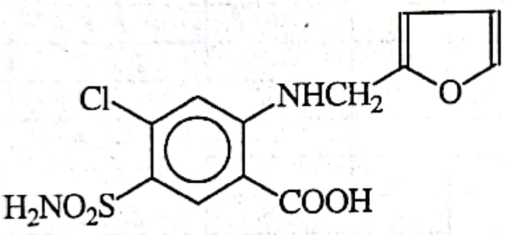


Clortalidona

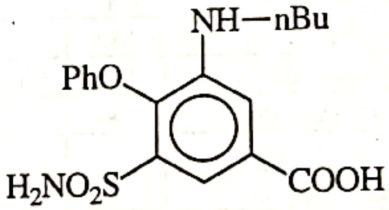


Indapamida

Structura celor mai importante două medicamente din această clasă este redată mai jos:



Furosemid



Bumetamid

De notat că şi la furosemid, respectiv bumetanid, în poziția *orto* față de gruparea sulfonamidică apar ca substituenți (clor, respectiv feniloxi-), ceea ce are drept consecință scăderea eficacității ca IAC a acestor compuşi. Un alt element structural important este prezența grupării carboxil în poziția *meta* față de cea sulfonamidică.

Situsul de acțiune al acestor agenți diuretici este zona ascendentă groasă a ansei lui Henle, unde elimină reabsorbția electroliților. Diureticele de ansă cresc fluxul sangvin renal, fără a mări viteza de filtrare, ceea ce contribuie de asemenea la mărirea reabsorbției electroliților în tubul proximal. Asemenea diureticelor tiazidice şi în acest caz se observă o mărire a excreției ionilor de K^+, Ca^{2+} şi Mg^{2+}, dar spre deosebire de acestea nu se remarcă creşterea reabsorbției ionului de calciu în tubul distal [290].

Scanned with OKEN Scanner

CONCLUZII

Pe parcursul acestei monografii am încercat să ilustrăm în detaliu aspecte legate de chimia, biochimia şi fiziologia unei enzime importante, mult răspândită pe întreaga scară filogenetică, de la arhebacterii şi eubacterii, la plante superioare, alge şi animale. În particular, la vertebrate, enzima este implicată în importante procese fiziologice, precum respiraţia, menţinerea homeostaziei organismului, secreţia de electroliţi într-o multitudine de ţesuturi şi organe. Existenţa unor variate clase de inhibitori puternici ai acestei enzime, dintre care sulfonamidele aromatice şi heterociclice reprezintă un caz bine studiat, a permis obţinerea unui număr important de agenţi farmacologici, cu aplicabilitate în tratamentul sau prevenirea multor maladii, de la glaucom sau ulcer gastro-duodenal, la diverse afecţiuni neurologice. „Istoria" anhidrazei carbonice şi a inhibitorilor săi nu se termină însă aici, deoarece în ultimul timp un mare număr de cercetări din acest domeniu s-a îndreptat spre design-ul de noi compuşi care interferă cu activitatea acestei enzime (ca activatori sau inhibitori enzimatici), în determinarea mecanismului de acţiune la nivel molecular a acestor compuşi, precum şi pentru noi aplicaţii în câmpul bio-medical. Printre altele, inhibitorii cu acţiune topică, ca medicamente antiglaucomatoase sunt în continuare mult investigaţi, astfel că în anul 1999 un al doilea medicament de acest tip a fost lansat în Statele Unite (brinzolamida), iar alte companii farmaceutice sunt în procesul de a dezvolta inhibitori topici cu eficienţă crescută, total lipsiţi de efectele secundare ale medicamentelor actualmente disponibile. Pe de altă parte, structura tridimensională a primului aduct al AC cu un activator – histamina – a fost recent raportată în literatura ştiinţifică de către unul dintre autorii acestei cărţi, ceea ce a permis o înţelegere la nivel superior a mecanismului catalitic al acestei enzime, precum şi explicarea diferenţelor de activitate între diversele izozime. Aceste date noi nu au fost însă incluse în prezentul volum din motive de spaţiu. Mulţumim încă o dată pe această cale colegilor care au contribuit la diferitele descoperiri ştiinţifice menţionate pe parcursul volumului.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. L. J. Henderson, in "Blood", Yale University Press, New Haven, 1928.
2. A. Thiele, *Ber. Dtsch. Chem. Gesel*, 1913, 46, 241-244.
3. C. Faurholt , *J. Chim. Phys*, 1924 , 21, 4 00-4 55 .
4. O.M. Henriques, *Biochem. Z.*, 1928, 200, 1-24.
5. D.D. Van Slyke, J.A. Hawkins, *J. Biol. Chem.*, 1930, 87, 265-279.
6. G. Adair, *J. Physiol*, 1924, 58, XXX IX.
7. N.U. Meldrum, F.J.W. Roughton, *J. Physiol*, 1933, 80, 113-142.
8. H. Davenport, J. *Physiol*, 1939, 97, 32-43.
9. H. Davenport, A .E. Wilhelmi, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, 48, 53-56 .
10. T. Mann, D. Keilin, *Nature*, 1540, 146, 164-165.
11. J. Friedenwald, *Am. J. Ophthalmol*, 1949, 32, 9-27.
12. P. J. Wistrand, *Acta Physioly Scand*, 1951, 44, 144-148.
13. V.E. Kinsey, *AMA Arch. Ophthalmol*, 1955, 50, 401-417.
14. a) R.O. Roblin, J.W. Clapp, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 4890-4892; b) W.H. Miller, A.M. Dessert, R.O. Roblin, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 4893-4896 .
15. T.H. Maren, E. Mayer, B.C. Wadsworth, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1954, 199-243.
16. T.H. Maren, *N.B. Physiol. Rev.*, 1967, 47, 595-781.
17. S. Lindskog, P.J. Wistrand, in "Design of Enzyme Inhibitors as Drugs", M. Sandler Ed., Oxford University, Oxford 1987, 698-723.
18. R.E. Tashian, D. Hewett-Emmett, P.J. Venta, in "Carbonic Anhydrase - From Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine", F. Botré, G. Gros, B.T. Storey Eds., VCH, Weinheim 1991, 151-161.
19. Lindskog, *Biochim. Biopys. Acta*, 1960, 35, 218-226.
20. P.O. Nyman, *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 1-12.
21. G. Laurent, M. Charrel, F. Luccioni, M.F. Autran, Y. Derrien, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 1101-1124.
22. E.E. Rickli, J.T. Edsall, J. *Biol. Chem.*, 1962, 237, PC 258-260.
23. J.M.D. Armstrong, D.V. Myers, J.A. Verpoorte, J.T. Bdsall, *J. Biol. Chem.*, 1966, 214, 5137-5149.
24. G. Laurent, M. Castay, C. Marriq, D. Garçon, M. Charrel, Y. Derrien, *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 77, 518-520.
25. P.O. Nyman, S. Lindskog, *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 85, 141-151.
26. S.J. Dodgson, in "Carbonic Anhydrase - From Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine", F. Botré, G. Gros, B.T. Storey Eds; VCH, Weinheim, 1991, pp. 339-344. I
27. a) A.G. Kendall, R.E. Tashian, Science, 1977, 197, 471-472; b) R.E. Tashian, A.G. Kendall, N.D. Carter, Hemoglobin, 1980, 4, 635-651.
28. a) W.S. Sly, D. Hewett-Emmett, M.P. Whyte, R.E. Tashian, *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA, 1983, 80, 2752-2756; b) W.S. S1y, S. Sato, X.L. Zhu, Clin. Bichem., 1991, 24, 311-318.
29. R.S. Holmes, *Eur. J. Biochem.*, 177, 78, 511-520.
30. A.M. Register, M.K. Koester, E.A. Noltman, *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 4143-4152.
31. N.D. Carter, S. Jeffrey, A. Shiels, Y. Edwards, T. Tipler, D.A. Hopkinson, *Biochem. Genetics*, 1979, 17, 837-854.

Scanned with OKEN Scanner

CONTENTS

FOREWORD 5

ABBREVIATION 9

1. INTRODUCTION. The role and place of carbonic anhydrase in the human body. Historical backgrounds 11

2. THE CARBONIC ANHYDRASE ISOZYMES 13

2.1. Purification, distribution and properties of carbonic anhydrase isozymes 13

2.2. Structure of the carbonic anhydrase active site 16

2.3. Kinetic and termodynamic aspects of reactions catalyzed by carbonic anhydrase 20

3. THE CATALYTIC MECHANISM OF CARBONIC ANHYDRASE 25

4. THE INHIBITION MECHANISM OF CARBONIC ANHYDRASE 29

4.1. Inhibition by monovalent anions 29

4.2. Inhibition by sulfonamides 45

4.3. Dual inhibition 60

4.4. CO_2-competitive inhibitors 61

5. SULFONAMIDES AS CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS 63

5.1.Classical inhibitors 63

5.1.1. *Aromatic sulfonamides* 63

5.1.2. *Heterocyclic sulfonamides* 71

5.1.3. *Bis-sulfonamides* 77

5.2. Selective inhibitors 75

5.2.1. *Topical sulfonamides as antiglaucoma agents* 79

5.2.2. *Selective cerebrovasodilators* 96

5.3. Inhibitors with modified sulfonamido groups 96

5.4. Isozyme-specific inhibitors 100

5.4.1. *Macromolecular inhibitors* 101

5.4.2.*Positively-charged sulfonamides* 102

5.5. Quantitative structure – activity relationship (QSAR) of carbonic anhydrase inhibitors 108

5.6. Aliphatic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors 110

Scanned with OKEN Scanner

6. COORDINATION COMPOUNDS AS CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS 113
6.1. Acetazolamide complexes 114
6.2. Methazolamide complexes 120
6.3. Ethoxzolamide complexes 123
6.4. Saccharin complexes 125
6.5. Complexes containing other sulfonamides 127
7. PHARMACOLOGY OF CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS 129
7.1. Systemic inhibitors 130
7.2. Topical inhibitors 134
8. APPLICATIONS OF CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS IN MEDICINE 137
8.1. Carbonic anhydrase inhibitors and the acid-base balance 137
8.2. Carbonic anhydrase inhibitors and the renal physiology 141
8.3. Applications în gastroenterology 146
8.3.1. *Carbonic anhydrase and the gastric secretory function* 146
8.3.2. *Treatment of gastro-duodenal ulcers with carbonic anhydrase inhibitors* 150
8.3.3. *The role of carbonic anhydrase in the intestinal tract and annex digestive glands* 153
8.4. Treatment of glaucoma with carbonic anhydrase inhibitors 154
8.5. Use of carbonic anhydrase inhibitors în epilepsy 157
8.6. Carbonic anhydrase inhibitors în the therapy of mountain and motion sickness 159
8.7. Carbonic anhydrase inhibitors and the bone substance 160
8.8. Use of radio-labelled carbonic anhydrase inhibitors as diagnostic tools in nuclear medicine 163
8.9. Benzothiazides and high-ceiling diuretics as carbonic anhydrase inhibitors 164
REFERENCES 168
ABSTRACT 181

Scanned with OKEN Scanner

ABSTRACT

The present work – *The Carbonic Anhydrase Inhibitors – Syntheses, Reactions and Therapeutically Applications* registers by topics in the domain of fundamental research monographs with major applicability in the therapy of some human or animal diseases. Book's theme, bridging the domain of enzymology and pharmacochemistry, envisages a class of pharmacological agents widely used in medical practice in the treatment of a large number of affections – the sulfonamides as inhibitors of enzyme carbonic anhydrase.

Structurally, the paper contains four parts. The first one (chapters 1–4) presents the up-to date knowledge, by means of literature data, about the history, structure and physiology of carbonic anhydrase, simultaneously with references regarding their inhibitors and purification and properties of known isoenzymes (from bacteria, plants, vertebrates). The structure of the active site of the isozymes more studied (types I–III) and the reactions catalysed by them constitute other notions presented in this section of the paper, concomitant with a detailed description of catalytic and inhibition mechanism of carbonic anhydrase. Connected with the description of these mechanisms, there are presented the principal methods of their study, especially spectroscopic and X-ray crystallographic techniques.

The second part of the work – chapter 5 – reviews the principal classes of carbonic anhydrase inhibitors of sulfonamidic type: aromatic and heterocyclic sulfonamides, bis-sulfonamides, inhibitors with modified sulfonamidic group or isozyme-specific.

For every class of inhibitors there are presented the syntheses of the compounds, the physico-chemical properties relevant for their biologic activity and inhibition data against diverse isoenzyme.

In the evaluation and presentation of the diverse notions connected with carbonic anhydrase inhibitors there was put a special accent on latest scientific acquisitions in this very dynamic field of research.

The third part of the monograph has a fundamental research character with direct applicability in day-to-day life but also an evident character of personal contribution in the field. This because chapter 6 presents a new class of carbonic anhydrase inhibitors - the co-ordination compounds of aromatic and heterocyclic sulfonamides. This class of inhibitors was reported in literature after 1990 by the authors of this monograph.

In the presentation of these co-ordination compounds of sulfonamides there were respected the principles of inhibitor's synthesis presenting and structure,

Scanned with OKEN Scanner

physicochemical and inhibitory property's determination of this compounds which are among the powerest drugs with inhibitory action against carbonic anhydrase.

The last part of the work has a strict pharmacological character, presenting the action-specificity of systemic and topic inhibitors, respectively their applications in the therapy of diverse acido-basic desequilibria, as diuretics or as useful medications in ulcerous disease, glaucoma, movement and altitude sickness, epilepsy, etc. Also in this last part of the monograph there is envisaged the possibility of using special-marked inhibitors of carbonic anhydrase in paraclinical exploration.

The notions and elements presented in the paper regarding the synthetic methods, the structure and physico-chemical and pharmacological properties of this inhibitory substances of carbonic anhydrase could constitute references for other researches like those of validation and implementing of new drugs of this type in the therapy of some diseases from human and veterinary pathology.

By its content the paper *The Carbonic Anhydrase Inhibitors – Syntheses, Reactions and Therapeutically Applications* could enter between the reference books in the domain. Such a bibliographic place is reserved to it not only by the character of its multi-sectorial theme, but also by its interdisciplinary one, because it addresses to a large category of specialists, from organic and bio-organic chemists to bio-inorganic chemists, biochemists, pharmacologists, pharmacists or physicians in different specialities from internists to ophthalmologists.

The book could be useful to the students from the previous-mentioned specialities or to those who want to enter in the "enzymatic catalitical world misters", to understand, at the molecular level, the action mode of some drugs, the appearance of some diseases or how can be those diseases healed by modulating the activity of an enzyme. Also the monograph *The Carbonic Anhydrase Inhibitors – Syntheses, Reactions and Therapeutically Applications* could be useful to biotechnologists.

Scanned with OKEN Scanner

Coperta 1: Complexul cu uree al anhidrazei carbonice, aşa cum rezultă în urma reacţiei de hidratare a cianamidei, un nou substrat al enzimei recent descoperit de către unul dintre autori.

IMPRIMAT ÎN ROMÂNIA

TIPOGRAFIA

BREN PROD SRL

Scanned with OKEN Scanner

De ce anhidraza carbonică?

Implicarea noastră în domeniul anhidrazei carbonice este relativ recentă, datând doar din anul 1987 când, ne-am confruntat, la fel ca multe alte persoane implicate în studiul acestui domeniu, cu întrebarea: *Este posibil să găseşti ceva nou despre o enzimă descoperită în 1933, care catalizează una dintre cele mai simple reacţii?* (cea dintre dioxidul de carbon şi apă).

Răspunsul la această întrebare este evident, ţinând cont de câteva aspecte ale chimiei şi biologiei anhidrazei carbonice. În primul rând, enzima este virtual prezentă în toate celulele organismelor vii, de la bacterii, alge, plante verzi, până la vertebrate superioare. În toate aceste sisteme biologice, anhidraza carbonică catalizează aceeaşi reacţie fiziologică – hidratarea dioxidului de carbon metabolic, cu formarea unui ion bicarbonat şi a unui proton. În organismul uman deţine un rol important în reglarea pH-ului intra- şi extracelular, formarea secreţiei gastrice, salivare, a umorii apoase, în procesele de excreţie renală, în procese respiratorii etc. Dereglările funcţionării sale conduc la afecţiuni majore, cum ar fi ulcere gastrice şi duodenale, glaucom, epilepsie, dezechilibre metabolice ale creierului, oaselor şi rinichilor, precum şi la o serie de alte tulburări neuro-vegetative. Inhibarea, respectiv activarea enzimei sunt, din acest punct de vedere deosebit de importante sub aspect clinic. Un ultim aspect ţine cont de diferitele reacţii catalizate de enzimă, care oferă un excelent exemplu de studiu al mecanismelor enzimatice de reacţie, în special asupra rolului legării substratului în cataliză.

Prezenta monografie detaliază aspectele de mai sus, coroborând date recente de literatură cu realizările personale ale autorilor în acest domeniu. Am încercat o îmbinare de date chimice, biochimice şi medicale, lucrarea fiind prin excelenţă interdisciplinară.

Autorii

ISBN 973-27-0731-3

Scanned with OKEN Scanner